

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Flávia Lidianne Oliveira da Silva**

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO  
BENZNIDAZOL COMO ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR A EFICÁCIA NO  
TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS**

**Diamantina**

**2019**

**Flávia Lidiane Oliveira da Silva**

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO  
BENZNIDAZOL COMO ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR A EFICÁCIA NO  
TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Insumos, Fármacos e Medicamentos, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Carneiro  
Coorientadora: Prof. Dra. Helen Rodrigues Martins

**Diamantina**

**2019**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586c

Silva, Flávia Lidiane Oliveira da  
Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo benznidazol como  
estratégia para aumentar a eficácia no tratamento da doença de Chagas  
/ Flávia Lidiane Oliveira da Silva, 2019.  
93 p. : il.

Orientador: Guilherme Carneiro  
Coorientadora: Helen Rodrigues Martins

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e  
Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Benznidazol. 2. Doença de Chagas. 3. Nanopartículas lipídicas.  
4. Trypanosoma cruzi. I. Carneiro, Guilherme. II. Martins, Helen  
Rodrigues. III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do  
Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 615**

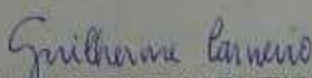
**Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo benznidazol como  
estratégia para aumentar a eficácia no tratamento da doença de  
Chagas**

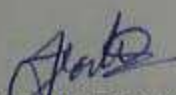
Dissertação apresentada ao  
MESTRADO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS, nível de  
MESTRADO como parte dos requisitos  
para obtenção do título de MESTRA  
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

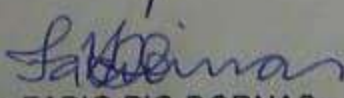
Orientador (a): Prof. Dr. Guilherme  
Carneiro

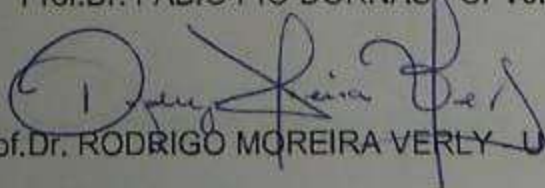
Co-orientadora: Prof. Dr. Helen  
Rodrigues Martins

Data da aprovação : 31/01/2019

  
Prof.Dr. GUILHERME CARNEIRO - UFVJM

  
Prof.Dr.<sup>a</sup> HELEN RODRIGUES MARTINS - UFVJM

  
Prof.Dr. FABIO PIO DORNAS - UFVJM

  
Prof.Dr. RODRIGO MOREIRA VERLY - UFVJM

## **AGRADECIMENTOS**

Dois anos não são dois dias, duas semanas ou dois meses, representam um período considerável na vida uma pessoa. Nestes últimos dois anos muitas pessoas passaram pela minha vida, foram importantes e deixaram a sua marca de algum modo e, por isso, tenho muito a agradecer.

Aos meus pais, Cleber e Nilda, por acreditar em mim sempre, apoiar as minhas escolhas e decisões, entender e respeitar a minha ausência e o meu silêncio. Uma das razões da minha felicidade é poder ser motivo de orgulho para vocês!

À minha irmã, Fernanda, por todo apoio e por nunca duvidar da minha capacidade, por ter me escolhido como exemplo, algo que ao mesmo tempo que é difícil, também é incentivo para que eu seja sempre melhor.

À minha madrinha e ao padrinho, tias, tios e primos que mesmo sem entenderem direito o que é um mestrado, sempre torceram por mim.

À Irmazinha e ao Gabriel, companheiros de faculdade, de mestrado, de casa, de vida, agradeço pelos momentos vividos e por todas as discussões na mesa da cozinha, sempre acompanhadas de algo gostoso para jantar. Ao Igor e a Amanda por todas as conversas e almoços de domingo. À Mirian, Luisa, Guizan, Tutu, Paulinha e Gabi, amigos que mesmo distância se fizeram presentes, amigos cujo apoio é fundamental.

Ao meu amigo e companheiro de laboratório Osmarzinho, pela parceria nos momentos bons e difíceis, pela ajuda diária e por tornar o dia a dia de trabalho muito mais leve e agradável.

Aos alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório nesse período, Isabela, Maria Luiza, Taciana e Martinez, muito obrigada pelos momentos compartilhados. Um agradecimento especial ao Martinez pelo auxílio nos experimentos iniciais do meu trabalho.

Às meninas da limpeza, Linda e companhia, por todo o carinho, preocupação e pelos cafés compartilhados.

À professora Kelly pelo auxílio nos experimentos biológicos, pelas discussões e conversas, além da companhia e da amizade.

Aos alunos do LADIP/LADOC por me receberem e pela ajuda nos experimentos biológicos. Um agradecimento especial a Itamara, que além da ajuda nos experimentos tem sido uma grande companheira, mesmo a distância, nessa reta final. Muito obrigada por todas as conversas!

Ao professor João Vinícios por disponibilizar o seu laboratório e a sonda de ultrassom para a realização dos experimentos com formulação. Por ser sempre prestativo e um exemplo de gentileza, muito obrigada!

À Dra. Maria Betânia da UFMG pela colaboração nos experimentos de análises térmica, por ter nos recebido tão bem e de forma tão atenciosa em seu laboratório, por todo o cuidado com experimentos e auxílio na análise dos dados.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada pelas análises de MEV e DRX e ao técnico Lúcio pelos experimentos de FTIR.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo auxílio financeiro na forma da bolsa de estudo concedida.

À minha coorientadora Helen por todos os ensinamentos, pelo apoio, pelas conversas e por ser um exemplo de profissional.

Ao meu orientador-amigo, amigo-orientador, Guilherme pelos últimos 5 anos de trabalho e de amizade. Muito obrigada por todo o tempo e dedicação que você investiu na minha formação profissional e pessoal. Muito obrigada por confiar em mim inclusive nos momentos que eu mesmo duvidei da minha capacidade. Muito obrigada por não me deixar desistir e por estar sempre presente. Muito obrigada pela parceria não ter ficado restrita apenas ao campo profissional, mas por ter se estendido para vida, desde o início. Guardo e levo comigo com muito carinho cada momento e aprendizado compartilhado. Obrigada por me ajudar a ser sempre melhor!

Por fim um agradecimento especial, talvez inusitado aos que não convivem comigo. Não posso deixar de agradecer ao meu gatinho Dobby, meu companheirinho durante toda a escrita desse trabalho, independente do horário. Minha válvula de escape nos momentos difíceis, meu suporte emocional, minha distração e motivo de sorriso nos dias mais cansativos. Obrigada por me ensinar a amar e me ensinar o que é o amor.

A todos que de alguma forma estiveram presentes em algum momento nos últimos dois anos.





“Eu tinha muito do que reclamar, mas daí pensei comigo mesmo – se o barco está chacoalhando tanto, é porque está saindo do lugar. Só existe calma pra quem se dá por vencido e desiste de remar.”

Matheus Rocha



## RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que atinge milhões de pessoas principalmente na América Latina e cujo tratamento permanece insatisfatório. O benznidazol (BZN) é considerado a primeira escolha para o tratamento devido a sua maior tolerabilidade pelos pacientes. Entretanto, este fármaco apresenta baixa solubilidade aquosa, absorção oral irregular, farmacocinética desfavorável, além de ocasionar vários efeitos adversos. A incorporação de fármacos com estas características em sistemas lipídicos nanoestruturados representa uma alternativa para melhorar estes fatores limitantes. Diante disso, o objetivo deste estudo foi desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia tripanocida *in vitro* de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo BZN. O desenvolvimento da formulação avaliou a influência do lípide líquido, da composição do sistema tensoativo, da concentração de lípidos e da concentração de BZN no tamanho, potencial zeta (PZ) e incorporação do fármaco no nanossistema. A formulação otimizada também foi caracterizada por espectroscopia no infravermelho, difração de raios-X, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e microscopia eletrônica de varredura. Avaliou-se também a estabilidade preliminar, o potencial hemolítico, toxicidade em células L929 e atividade tripanocida em formas epimastigotas do *T. cruzi*. O CLN-BZN desenvolvido apresentou morfologia esférica, diâmetro médio compatível à administração oral ( $110 \pm 3$  nm), PZ negativo e preditivo de estabilidade ( $-18,0 \pm 2,6$  mV), além de alto teor de encapsulação de BZN ( $82,6 \pm 2,1\%$ ). A atividade tripanocida do CLN-BZN foi similar ao fármaco livre até a concentração de  $31 \mu\text{g/mL}$ . Contudo a formulação apresentou baixo potencial hemolítico e menor toxicidade em células L929 em comparação ao BZN livre. Estes resultados sugerem que a formulação desenvolvida apresenta características adequadas para a administração oral, sendo assim uma alternativa promissora para o tratamento da DC.

**Palavras-chave:** benznidazol; doença de Chagas; sistemas de liberação de fármaco; nanopartículas lipídicas; carreadores lipídicos nanoestruturados; *Trypanosoma cruzi*.



## ABSTRACT

Chagas disease (CD) is an anthroponosis caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which affects millions of people mainly in Latin America with unsatisfactory treatment. Benznidazole (BZN) is related as first choice for treatment since presents greater tolerability by patients. However, this drug shows low aqueous solubility, irregular oral absorption, unfavorable pharmacokinetics, resulting several adverse effects. In that way, incorporation of drugs with these characteristics into nanostructured lipid systems represents an alternative to improve these limiting factors. In this context, the aim of this study is based on development, characterization and evaluation of *in vitro* trypanocidal efficacy of nanostructured lipid carriers (NLC) loaded with BZN. The influence of liquid lipid, surfactant system composition, lipid concentration and BZN concentration on size, zeta potential (ZP) and incorporation of the drug in the nanosystem were evaluated for each formulation. The optimized formulation was also characterized by infrared spectroscopy, X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, thermogravimetry and scanning electron microscopy. Preliminary stability, hemolytic potential, toxicity in L929 cells and trypanocidal activity in *T. cruzi* epimastigote forms were also carried out. NLC-BZN showed spherical morphology, mean diameter compatible with oral administration ( $110 \pm 3$  nm), Zp negative and predictive of stability ( $-18,0 \pm 2,6$  mV), and high encapsulation efficiency of BZN ( $82,6 \pm 2,1\%$ ), which was proved by the other characterizations. The optimized formulation showed low hemolytic potential and lower toxicity in L929 cells compared to free BZN, and trypanocidal activity was similar to the free drug up to the concentration of  $31 \mu\text{g/mL}$ . These results suggest that the optimized formulation presents highlight characteristics for oral administration, representing a promising alternative for the treatment of DC.

**Keywords:** Benznidazole; Chagas disease, drug delivery systems; lipid nanoparticles; nanostructured lipid carriers; *Trypanosoma cruzi*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição mundial da DC: estimativas oficiais entre 2006-2009.....	26
Figura 2 - Principais formas do <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	27
Figura 3 - Transmissão vetorial e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	30
Figura 4 - História natural da doença de Chagas. ....	31
Figura 5 - Estrutura química do benznidazol. ....	36
Figura 6 - Representação esquemática da via metabólica proposta para o benznidazol. ....	37
Figura 7 – Principais tipos de sistemas lipídicos para liberação de fármacos. ....	41
Figura 8 - Tipos de nanopartículas lipídicas sólidas considerando a distribuição de fármaco. ....	45
Figura 9 -Tipos de CLN dependendo da estrutura da matriz lipídica. ....	47
Figura 10 – Representação esquemática do preparo dos CLN. ....	52
Figura 11 - Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração total de BZN. ....	55
Figura 12 - Representação esquemática da metodologia para a determinação da concentração de BZN filtrado.....	55
Figura 13 - Histograma de distribuição de tamanho do CLN F. ....	62
Figura 14 - Influência do lípide líquido e do sistema tensoativo no TE.....	62
Figura 15 - Influência da concentração de lípides no TE. ....	63
Figura 16 - Influência da concentração de BZN no TE (A) e na concentração de BZN incorporado nos CLN (B). ....	64
Figura 17 - Espectro de absorção no infravermelho das substâncias puras (A) e CLN-BR, CLN-BZN e mistura física (B). ....	66
Figura 18 - Difratogramas das matérias-primas sólidas (A) e dos CLN com e sem BZN e da mistura física (B). ....	67
Figura 19 - Curvas de DSC dos componentes, CLN-BZN e CLN-BR sob atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de 10 °C/min. ....	68
Figura 20 - Curvas de TG do BZN, CLN-BR e CLN-BZN, sob atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de 10 °C/min. ....	70
Figura 21 - Micrografias do CLN-BZN em aumento de 25.000x (A) e 50.000x (B). ....	71
Figura 22 - Estabilidade do CLN F ao longo de 60 dias, em relação diâmetro médio e IP (A), PZ (B), retenção de BZN (C) e pH (D). ....	72
Figura 23 - Atividade hemolítica do BZN, CLN-BZN e CLN-BR. ....	73
Figura 24 - Viabilidade celular da linhagem L929 após 72h de tratamento.....	74

Figura 25 - Viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* após 72h de tratamento. 75



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Solubilidade do BZN.....	36
Tabela 2 - Propriedades das emulsões, microemulsões e nanoemulsões .....	43
Tabela 3 - Composição dos CLN (% p/v) contendo BZN 0,05%. ....	53
Tabela 4 - Variação na concentração de lípides (% p/v) e na composição dos tensoativos utilizados nos CLN contendo BZN 0,05%. ....	53
Tabela 5 - Caracterização dos CLN-BZN quanto a diâmetro, IP, PZ e TE.....	61
Tabela 6 - Influência da concentração de lípides no diâmetro, IP e PZ dos CLN.....	63
Tabela 7 - Influência da concentração de BZN nas características dos CLN.....	64
Tabela 8 - Fenômeno, temperatura ( $T_{onset}$ , °C) e calor ( $\Delta H$ , J/g) encontrados nas curvas DSC dos CLN e seus insumos farmacêuticos. ....	69



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATR	Reflectância total atenuada
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
BZN	Benznidazol
BZN-nps	Nanopartículas de BZN
CD	Ciclodextrina
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
DC	Doença de Chagas
DLS	Espalhamento dinâmico da luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas
DP	Desvio padrão
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTU	Unidades discretas de tipagem
ELISA	Ensaio de imunossorvente ligado a enzimas
FA	Fase aquosa
FO	Fase oleosa
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IP	Índice de polidispersão
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado do Pernambuco
L-HPC	Hidroxipropilcelulose pouco substituída
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i> (meio de cultura)
Log P	Coeficiente de partição
ME	Microemulsão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NE	Nanoemulsão

NFX	Nifurtimox
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
PTFE	Polietrafluoretileno (teflon)
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PZ	Potencial zeta
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura)
SFB	Soro fetal bovino
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanossoma cruzi</i>
TCM	Triglicérides de cadeia média
TE	Teor de encapsulação
TG	Termogravimetria
THF	Tetraidrofurano

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Doença de Chagas</b>	<b>25</b>
<i>2.1.1 Trypanosoma cruzi</i>	<i>27</i>
<i>2.1.2 Ciclo biológico e formas de transmissão</i>	<i>28</i>
<i>2.1.3 Fases clínicas da doença de Chagas</i>	<i>30</i>
<i>2.1.4 Diagnóstico da doença de Chagas</i>	<i>33</i>
<b>2.2 Tratamento farmacológico da doença de Chagas</b>	<b>34</b>
<i>2.2.1 Benznidazol</i>	<i>35</i>
<b>2.3 Alternativas para melhorar a biodisponibilidade do benznidazol</b>	<b>39</b>
<b>2.4 Sistemas lipídicos nanoestruturados</b>	<b>41</b>
<i>2.4.1 Lipossomas</i>	<i>42</i>
<i>2.4.2 Microemulsões e nanoemulsões</i>	<i>42</i>
<i>2.4.3 Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados</i>	<i>44</i>
<i>2.4.4 Sistemas lipídicos nanoestruturados contendo benznidazol</i>	<i>47</i>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	<b>49</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Materiais</b>	<b>51</b>
<b>4.2 Preparo dos CLN</b>	<b>51</b>
<i>4.2.1 Desenvolvimento da formulação de CLN contendo BZN</i>	<i>52</i>
<b>4.3 Caracterização química e físico-química dos CLN</b>	<b>54</b>
<i>4.3.1 Determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão</i>	<i>54</i>
<i>4.3.2 Determinação do potencial zeta</i>	<i>54</i>
<i>4.3.3 Determinação do teor de encapsulação</i>	<i>54</i>
<i>4.3.4 Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier</i>	<i>56</i>
<i>4.3.5 Difração de raios X</i>	<i>56</i>
<i>4.3.6 Análises térmicas</i>	<i>57</i>
<i>4.3.7 Microscopia eletrônica de varredura</i>	<i>57</i>
<b>4.4 Avaliação da estabilidade preliminar</b>	<b>58</b>

<b>4.5 Avaliação da atividade hemolítica</b>	<b>58</b>
<b>4.6 Estudos de atividade <i>in vitro</i></b>	<b>59</b>
<b>4.6.1 Linhagem celular</b>	<b>59</b>
<b>4.6.2 Viabilidade celular</b>	<b>59</b>
<b>4.6.3 Atividade tripanocida</b>	<b>60</b>
<b>4.7 Análises estatísticas</b>	<b>60</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>61</b>
<b>5.1 Influência da composição sobre as características físico-químicas dos CLN-BZN</b>	<b>61</b>
<b>5.2 Espectroscopia na região do infravermelho</b>	<b>65</b>
<b>5.3 Difração de raios-X</b>	<b>67</b>
<b>5.4 Calorimetria exploratória diferencial</b>	<b>68</b>
<b>5.5 Termogravimetria</b>	<b>69</b>
<b>5.6 Microscopia eletrônica de varredura</b>	<b>70</b>
<b>5.7 Avaliação da estabilidade preliminar</b>	<b>71</b>
<b>5.8 Avaliação da atividade hemolítica</b>	<b>72</b>
<b>5.9 Avaliação da viabilidade celular</b>	<b>73</b>
<b>5.10 Avaliação da atividade tripanocida</b>	<b>74</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>77</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da doença de Chagas (DC), uma antroponose cuja principal forma de transmissão é a transmissão vetorial e que acomete milhões de pessoas, principalmente na América Latina (WHO, 2018). Devido a programas de controle vetorial e testes compulsórios em bancos de sangue, a prevalência da doença tem diminuído. Entretanto, estima-se que a DC seja responsável por 12 mil mortes anuais e que ocorram 56 mil novos casos por ano (OPAS, 2018).

Duas fases clínicas distintas são observadas na DC, uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda é caracterizada por elevada parasitemia inicial, tem duração de 4 a 8 semanas e é assintomática na maioria dos indivíduos. A fase crônica sucede a fase aguda e caracteriza-se pela substancial diminuição da parasitemia e os pacientes podem permanecer assintomáticos (forma indeterminada) ou apresentar manifestações clínicas, cardíacas e/ou digestivas (Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017; Sales Junior *et al.*, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018).

O tratamento farmacológico da DC permanece o mesmo desde os anos 70 e baseia-se em dois fármacos, o nifurtimox (NFX) e o benznidazol (BZN). Ambos os fármacos apresentam taxas de cura parasitológica acima de 80% na fase aguda, porém são pouco eficazes na fase crônica tardia da doença (Docampo, 2011; Morilla; Romero, 2015). Além disso, tanto o BZN quanto o NFX são responsáveis por vários efeitos adversos, o que podem levar a interrupção do tratamento pelos pacientes. Como o BZN apresenta melhor tolerabilidade é preferido em relação ao NFX e considerado o fármaco de primeira escolha no tratamento da DC (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010; Pérez-Molina; Molina, 2018).

Por outro lado, o BZN não é um fármaco ideal, uma vez que apresenta baixa solubilidade aquosa, absorção oral irregular e toxicidade. Assim, o uso de alternativas tecnológicas pode ser promissor devido à possibilidade de aumento da solubilidade e dissolução do fármaco com consequente melhora na biodisponibilidade, além de redução de efeitos adversos (Ferraz *et al.*, 2018). Algumas alternativas para melhorar a biodisponibilidade do BZN foram propostas, como a incorporação do fármaco em micropartículas de quitosana (Leonardi *et al.*, 2009), complexação com ciclodextrinas (Maximiano *et al.*, 2011a; Soares-Sobrinho; Soares, 2011; Soares-Sobrinho *et al.*, 2012), microcristais (Maximiano *et al.*, 2011b) e nanocristais de BZN (Scalise *et al.*, 2016) e a inclusão em dispersões sólidas (Leonardi; Salomon, 2013; Palmeiro-Roldán *et al.*, 2014; Fonseca-Berzal *et al.*, 2015b).

Outra possibilidade seria a associação do BZN a nanossistemas lipídicos, como os carreadores lipídicos nanoestruturados, que apresentam grande potencial para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água (Gaba *et al.*, 2014). Além disso, são constituídos por excipientes bem tolerados e de baixa toxicidade e são capazes de modular a liberação do ativo (Müller; Radtke; Wissing, 2002).

Até o momento apenas três sistemas deste tipo foram desenvolvidos, lipossomas (Morilla *et al.*, 2002), nanoemulsões (Streck *et al.*, 2014) e microemulsões contendo BZN (Streck *et al.*, 2016) e todos estes apresentaram baixa encapsulação, caracterizada pela baixa razão fármaco/lípide. Assim, considerando que o tratamento disponível para a DC ainda não é satisfatório, permanecendo com as suas diversas limitações e que os sistemas lipídicos desenvolvidos até o momento apresentaram um baixo potencial para carreamento de BZN, o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo BZN representam uma alternativa potencial para reduzir a toxicidade e aumentar a eficácia do tratamento da DC.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, foi descrita em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, que elucidou de maneira minuciosa o ciclo de transmissão da doença, ou seja, identificando o vetor, o hospedeiro e um novo organismo infeccioso, o *Trypanosoma cruzi*. Além disso, foram identificadas as manifestações clínicas agudas do primeiro caso humano da doença (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010; Coura; Viñas; Junqueira, 2014; Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018).

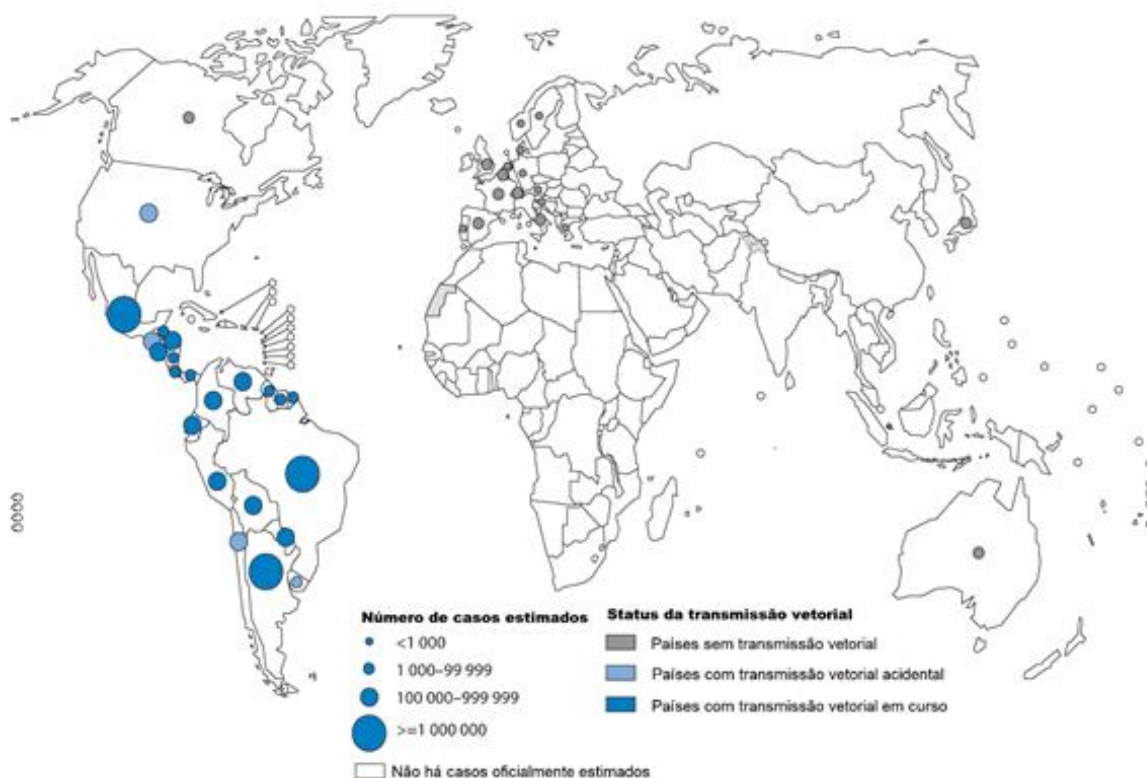
Inicialmente, a DC era uma enzootia silvestre, com ciclo de transmissão ocorrendo entre os animais e o vetor, insetos hematófagos da subfamília *Triatominae*, popularmente denominados barbeiros. A inclusão do homem no ambiente natural dos triatomíneos, devido à ocupação predatória destes espaços, transformou a doença em uma antropozoonose. As espécies de vetores adaptaram-se e passaram a se alimentar de sangue humano e animal, estabelecendo, assim, o atual ciclo de transmissão vetorial (Ferreira; Branquinho; Cardarelli-Leite, 2014; García; Manzo; Jimenez-Kairuz, 2015; Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017).

Considerada uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas, a DC atinge aproximadamente 8 milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente na América Latina (Figura 1), sendo que 100 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão da doença (WHO, 2018). Dentre os países da América Latina, Brasil, México, Argentina e Bolívia são os que possuem as maiores taxas de prevalência de pessoas infectadas, com aproximadamente 60% dos casos estimados, equivalente a cerca de 4 milhões de casos (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010; Dias *et al.*, 2016). Estima-se que ocorram 56 mil novos casos por ano e que a DC seja responsável por 12 mil mortes anuais (OPAS, 2018). No Brasil, a estimativa é entre 2 e 3 milhões de pessoas infectadas, com incidência média de 100 novos casos por ano (Oliveira *et al.*, 2008). Entre os anos 2000 e 2013 foram notificados 1.570 casos de DC aguda no Brasil, com a maior parte dos casos concentrando-se na região Norte (1430 casos) (Dias *et al.*, 2016).

Os programas de controle vetorial e os testes compulsórios em bancos de sangue representam as medidas mais eficazes para o controle da DC. Com essas medidas, reduziu-se a prevalência da doença e a interrupção da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* foi alcançada em 1997 no Uruguai, em 1999 no Chile e em 2006 na maior parte do território

brasileiro. Em 2010 Costa Rica, El Salvador e México conseguiram a interrupção da transmissão vetorial pelo *Rhodnius prolixus*. Entretanto, em regiões como a bacia amazônica e algumas áreas do Gran Chaco, ocorreu um aumento na frequência de transmissão devido, respectivamente, à transmissão oral e à resistência dos vetores aos piretroides (Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017; Sales Junior *et al.*, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018; WHO, 2018).

**Figura 1 - Distribuição mundial da DC: estimativas oficiais entre 2006-2009.**



Fonte: Adaptado de WHO, 2010.

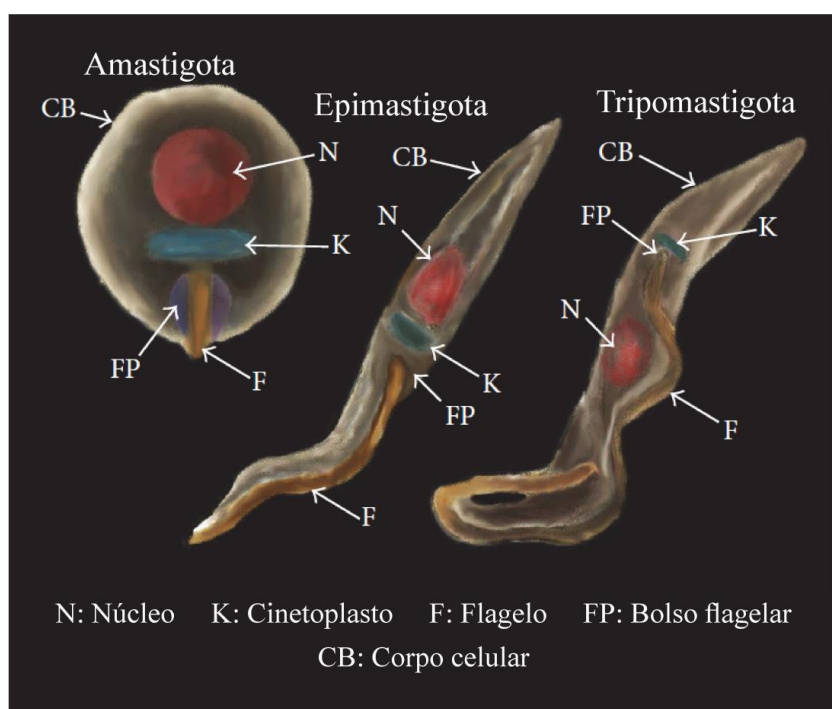
Apesar da DC ter sido descoberta há mais de um século, os desafios para a obtenção de resultados efetivos no seu controle ainda são muitos. Assim, estão incluídos o investimento baixo ou ausente; a ineficiência dos governos em fornecer treinamento médico, acesso inadequado ao diagnóstico e ao tratamento; falta de interesse do setor privado no desenvolvimento de melhores testes de diagnóstico e medicamentos; e ausência de dados epidemiológicos precisos sobre a doença (Pinheiro *et al.*, 2017).

### 2.1.1 *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico causador da DC é o *Trypanosoma cruzi*. Esta espécie de protozoário está classificada no reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophera, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (Neves *et al.*, 2011). Há três formas principais do parasita (Figura 2): **epimastigota**, forma replicativa presente no vetor e em cultura axênica; **tripomastigota**, forma infectante e não replicativa; e **amastigota**, forma intracelular e de replicação (Dias; Dessoy, 2009; Pech-Canul; Monteón; Solís-Oviedo, 2017). A forma tripomastigota pode ser considerada como dois diferentes estágios de desenvolvimento: **tripomastigota sanguíneo**, encontrado no sangue do hospedeiro vertebrado e **tripomastigota metacíclica**, encontrado no reto do inseto vetor (Pech-Canul; Monteón; Solís-Oviedo, 2017).

O parasita em sua forma tripomastigota é alongado, com cinetoplasto (organela rica em DNA) posterior ao núcleo e flagelo formando uma extensa membrana ondulante, tonando-se livre na porção anterior da célula. As formas amastigotas são arredondadas, com flagelo curto e que não se exterioriza. As formas epimastigotas são alongadas, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo e com uma pequena membrana ondulante lateralmente disposta (Neves *et al.*, 2011)

**Figura 2 - Principais formas do *Trypanosoma cruzi*.**



Fonte: Adaptado de Pech-Canul; Monteón; Solís-Oviedo, 2017.

Atualmente as cepas do parasita são classificadas em seis linhagens genéticas ou DTUs (unidades discretas de tipagem, do inglês *discrete typing units*), designadas TcI a TcVI, com cada DTU contendo várias cepas (Zingales *et al.*, 2009; Balouz; Agüero; Buscaglia, 2017). Uma potencial sétima DTU foi recentemente identificada em morcegos na América do Sul e Central, nomeada Tcbat (Zingales *et al.*, 2012).

O *T. cruzi* é uma espécie com reconhecida diversidade genotípica e fenotípica e podem ocorrer diferenças de até 40% no conteúdo de DNA entre as diferentes cepas do parasita (Zingales, 2018). Uma correlação direta entre a gravidade da doença e a linhagem do parasita ainda não foi estabelecida, mas sabe-se que diferentes cepas do *T. cruzi* apresentam sensibilidade variável em relação aos fármacos atualmente disponíveis (Soeiro *et al.*, 2013; Zingales *et al.*, 2015). Por exemplo, as cepas CL-Brener e Tulahuen (TcVI) são consideradas sensíveis aos fármacos enquanto que a cepa Y (TcII) é considerada parcialmente resistente e a cepa Colombiana (TcI) é altamente resistente (Soeiro *et al.*, 2013). Entretanto não há uma correlação absoluta entre o tipo de linhagem e a resistência ao BZN ou NFX, uma vez que grande variação intra-grupo também é observada (Toledo *et al.*, 2004).

### 2.1.2 Ciclo biológico e formas de transmissão

Na região das Américas, a transmissão vetorial é a principal forma de transmissão da DC (WHO, 2018). Dentre as principais espécies de vetores no Brasil estão o *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasilienses*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*, os quais são adaptados não só ao ambiente silvestre, mas também ao ambiente doméstico. A transmissão vetorial por *T. infestans*, que é o único vetor estritamente doméstico, já foi interrompida no Brasil, Chile e Uruguai (Coura; Dias, 2009). Com relação aos reservatórios da doença, existem mais de 100 espécies de reservatórios selvagens do parasita, incluindo marsupiais, morcegos, roedores, tatus, coelhos e primatas não-humanos (Coura, 2015). Cães, gatos, ratos domésticos, camundongos e porquinhos-da-índia são os reservatórios domésticos importantes nos países em que estes animais são criados em casa (Coura; Dias, 2009).

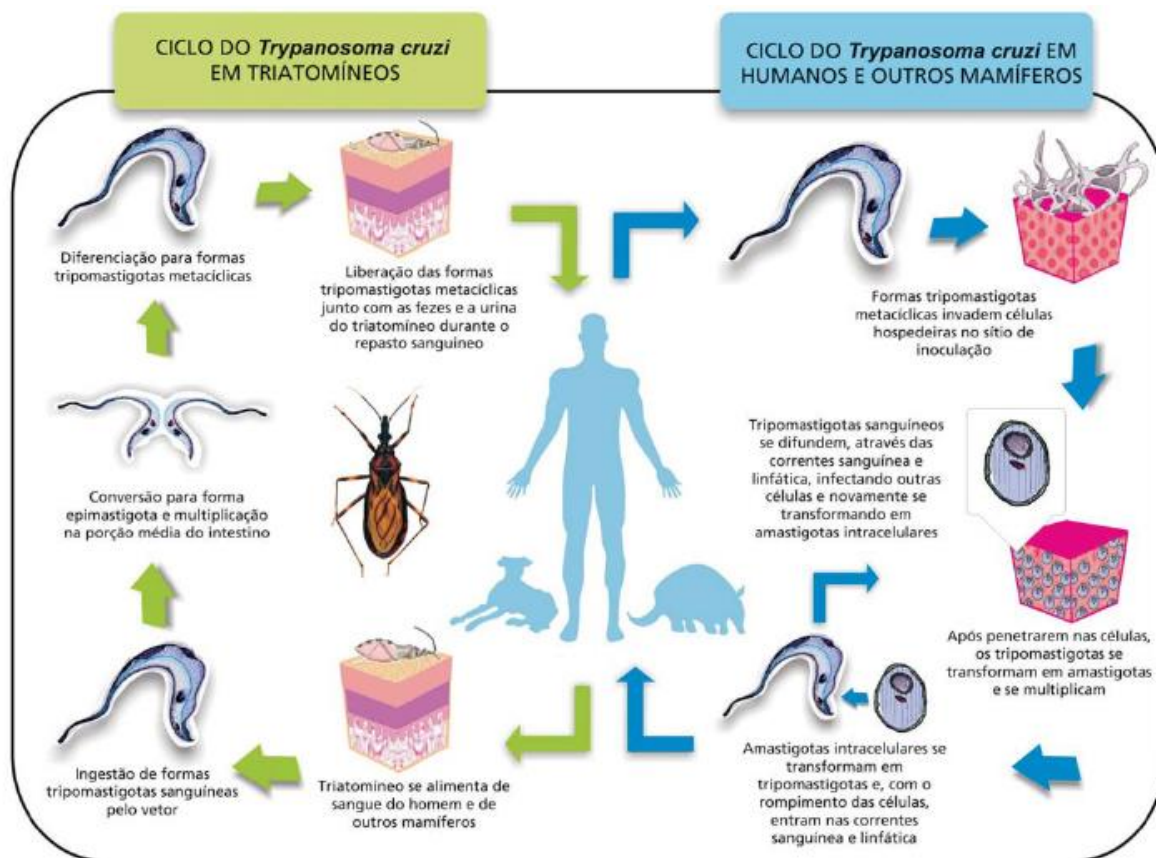
O ciclo de vida do *T. cruzi* (Figura 3) tem início com a deposição de tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes e urina do vetor sobre a pele ou mucosas do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. O hospedeiro tende a coçar a área da picada do inseto e com isso introduz o parasita na corrente sanguínea. Ao atingirem a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas infectam vários tipos celulares (Rassi Jr; Rassi; Marin-

Neto, 2010; Machado *et al.*, 2012; Zingales *et al.*, 2014; Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018).

Dentro das células, as formas tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam ativamente por divisão binária. Após a multiplicação, as formas amastigotas intracelulares se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas e, com o rompimento das células, são liberadas na corrente sanguínea e podem infectar novas células (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010; Zingales *et al.*, 2014; Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018).

Ao fazer um novo repasto sanguíneo, o triatomíneo ingere as formas tripomastigotas sanguíneas que, no intestino médio do vetor, se diferenciam em epimastigotas. As formas epimastigotas se multiplicam e diferenciam em tripomastigotas metacíclicas no intestino posterior do inseto, que serão eliminadas nas fezes e na urina durante um novo repasto sanguíneo, renovando o ciclo de transmissão. A probabilidade de que um triatomíneo seja infectado com o parasita aumenta de acordo com o número de repastos sanguíneo, de modo que os vetores adultos tendem a ter as maiores taxas de infecção (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010; Machado *et al.*, 2012; Zingales *et al.*, 2014; Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018).

**Figura 3 - Transmissão vetorial e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.**



Fonte: Argolo *et al.*, 2008.

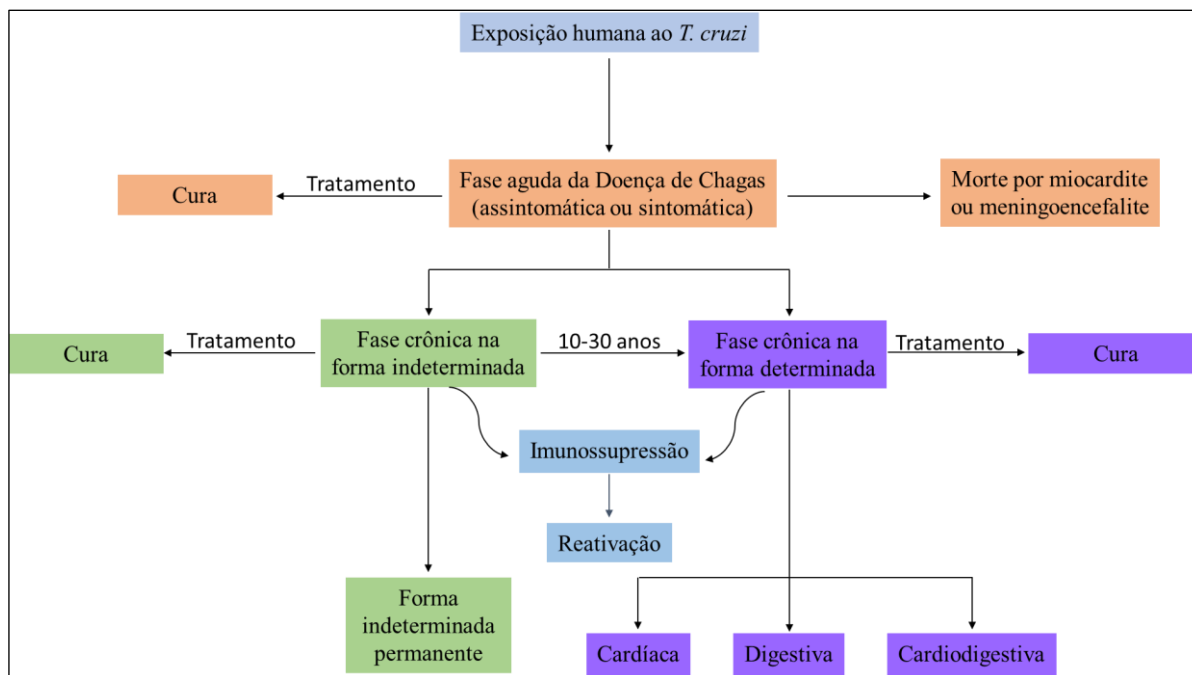
A DC também pode ser transmitida ao homem por mecanismos não-vetoriais, como por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos (~15%), transmissão congênita (4%), ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com o parasita (<1%), acidentes laboratoriais (<1%) (Romero; Morilla, 2010). Em países não endêmicos e zonas urbanas, as principais formas de transmissão são por transfusão sanguínea e a transmissão congênita (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010). A transmissão oral do *T. cruzi* tem tido sua relevância epidemiológica ampliada no Brasil, com a notificação de 1081 casos entre 2000 a 2013 e tem sido geralmente responsável por surtos regionais de infecção aguda em áreas desprovidas de vetores domiciliados (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010; Dias *et al.*, 2016).

### 2.1.3 Fases clínicas da doença de Chagas

A DC apresenta duas fases clínicas distintas: aguda e crônica (Figura 4). Na maioria dos indivíduos, independentemente do mecanismo de transmissão, a infecção aguda geralmente é assintomática, com período de incubação de 1 a 2 semanas e duração de 4 a 8 semanas. Esta

fase é caracterizada por elevada parasitemia inicial, que após o período de incubação diminui substancialmente (Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017; Sales Junior *et al.*, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018).

**Figura 4 - História natural da doença de Chagas.**



Fonte: Adaptado de Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010.

Dentre os sintomas que podem ocorrer, estão incluídos febre prolongada, mal-estar, aumento do fígado, baço e linfonodos e edema subcutâneo (localizado ou generalizado). Os sinais de porta de entrada do *T. cruzi* através da pele (chagoma de inoculação) ou através das membranas mucosas oculares (sinal de Romana) referem-se, em particular, à transmissão vetorial e podem auxiliar o diagnóstico. Estes sinais estão associados à inflamação local desencadeada pela presença do parasita (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010; Sales Junior *et al.*, 2017). A doença aguda grave ocorre entre 1 a 5% dos pacientes e inclui manifestações como miocardite aguda, derrame pericárdico e meningoencefalite, com alguns casos podendo evoluir para óbito (0,2 - 0,5%) (Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017; Sales Junior *et al.*, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018).

O dano orgânico na fase aguda da DC é secundário à ação direta do parasita e à resposta inflamatória aguda. Ninhos de amastigotas são encontrados em tecidos, principalmente músculo cardíaco, esquelético e liso, mas também no sistema nervoso central, gônadas e sistema fagocítico mononuclear. A intensa resposta inflamatória é responsável pela diminuição da

parasitemia, com produção de anticorpos e ativação da resposta imune inata por citocinas pró-inflamatórias  $T_H1$ , como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  e o interferon  $\gamma$  (Pérez-Molina; Molina, 2018). Apesar disso, a patogênese da doença ainda não é completamente compreendida, ainda que a persistência do parasita parece ser necessária para o desenvolvimento da doença (Rassi Jr., 2010).

Com a diminuição da parasitemia, tem início a fase crônica da doença, que pode ser classificada nas seguintes formas clínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (OPAS, 2009; Zingales *et al.*, 2014). A fase crônica indeterminada acomete cerca de 60-70% dos indivíduos infectados, que permanecem assintomáticos por longo período de tempo ou até permanentemente, não desenvolvendo doença clinicamente aparente (Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017). Estes indivíduos assintomáticos podem ser uma fonte de infecção de novos vetores, bem como levar a doença para outras partes do mundo em decorrência de desconhecimento de ser portador, além do risco de transmissão congênita ou mesmo por doação de órgãos (Pedra *et al.*, 2011).

A forma indeterminada da DC é caracterizada por alterações patológicas pouco significativas e isto dificulta o diagnóstico clínico. Apesar disso, nesta fase, os testes sorológicos geralmente são positivos, o que permite o diagnóstico caso estes exames sejam solicitados (OPAS, 2009).

Entre 10 a 30 anos após a infecção, 30-40% dos indivíduos desenvolvem uma das três formas crônicas sintomáticas. A forma cardíaca é a mais comum, afetando cerca de 20 a 30% dos pacientes infectados, enquanto as formas digestivas e cardiodigestiva afetam aproximadamente 10% dos pacientes crônicos sintomáticos (Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017; Sales Junior *et al.*, 2017). A reagudização da DC pode ocorrer em pacientes cronicamente infectados que se tornem imunocomprometidos, como em caso de coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou em tratamento com fármacos imunossupressores (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010).

Na forma cardíaca crônica, ocorre uma miocardite de baixa intensidade, de lenta progressão, mas que leva ao comprometimento da função contrátil e à dilatação do coração. O exame histológico mostra uma destruição ampla e disseminada de células miocárdicas, fibrose difusa, edema e infiltração de células mononucleares. O paciente torna-se predisposto à insuficiência cardíaca e a ter arritmias ventriculares devido à destruição progressiva das fibras cardíacas e a fibrose intensa (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010).

A cardiomiopatia chagásica crônica se manifesta por meio da coexistência de três síndromes: arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca e tromboembolismo (Carvalho;



Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017). A patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica não está completamente compreendida, mas as consequências da doença parecem ser autoimunes. Autoantígenos que reagem de forma cruzada com antígeno *T. cruzi* foram identificados, entretanto o papel da autoimunidade ainda não está completamente esclarecido (Pérez-Molina; Molina, 2018). A morte súbita é a principal causa de morte em pacientes com a forma cardíaca da DC, seguida de insuficiência cardíaca refratária (25-30%) e tromboembolismo (10-15%) (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010).

A forma digestiva é caracterizada pela presença de megaesôfago e/ou megacólon, que são, respectivamente, alargamentos do esôfago e do cólon. O megaesôfago provoca sintomas como disfagia, refluxo esofágico, perda de peso, tosse e regurgitação, além de desnutrição, caso a deglutição seja severamente prejudicada. O megacólon é responsável por causar distensão abdominal e constipação severa e, em casos mais graves, obstrução intestinal. A forma cardiodigestiva é definida pela associação entre a forma cardíaca com megaesôfago e/ou megacólon (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010; Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018).

#### **2.1.4 Diagnóstico da doença de Chagas**

Como na fase aguda há uma elevada parasitemia inicial, o principal método diagnóstico e padrão ouro é o exame parasitológico direto, baseado na detecção microscópica de tripomastigotas em amostras de sangue (Balouz; Agüero; Buscaglia, 2017; Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017). Os parasitas podem ser observados através de um simples exame de sangue fresco ou em esfregaços de sangue finos e grossos corados com Giemsa. Métodos de concentração como o microhematócrito e o método de Strout elevam a sensibilidade do método diagnóstico e devem ser utilizados sempre que os exames diretos sejam negativos. Apesar disso a sensibilidade continua como uma limitação destes métodos, sendo de aproximadamente 80-90% e devido a isso recomenda-se que sejam realizados por profissionais altamente treinados (Balouz; Agüero; Buscaglia, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018).

Na fase crônica, este exame não é indicado para o diagnóstico devido à baixa parasitemia. O diagnóstico nesta fase é realizado através da detecção de anticorpos IgG antitripanossomo por pelo menos dois dos seguintes métodos: ensaio de imunossorvente ligado a enzimas (ELISA), imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010; Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017). No caso de resultados discordantes, deve-se fazer uma nova coleta, repetir os testes e, permanecendo a discordância,

uma terceira técnica deve ser realizada (Balouz; Agüero; Buscaglia, 2017). A reação em cadeia da polimerase (PCR) não é um teste útil no diagnóstico individual de rotina devido à necessidade de instalações laboratoriais específicas, falta de padronização, potencial contaminação cruzada e resultados variáveis entre laboratórios. No entanto, devido à elevada sensibilidade é útil para confirmar o diagnóstico em casos de sorologia inconclusiva e como método auxiliar para monitorar o tratamento (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010).

No caso de infecção por transmissão congênita, o diagnóstico é realizado por meio da visualização microscópica direta de tripomastigotas no sangue periférico ou do cordão umbilical do neonato e, ocasionalmente, em outros fluidos corporais como o líquido cefalorraquidiano, utilizando métodos de concentração para aumentar a sensibilidade. Para hipótese de infecção congênita, o diagnóstico também pode basear-se em resultados sorológicos positivos após oito meses do nascimento (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010; Pérez-Molina; Molina, 2018).

## **2.2 Tratamento farmacológico da doença de Chagas**

Desde a década de 70 o benznidazol (BZN) e o nifurtimox (NFX) são os únicos fármacos disponíveis, sendo, respectivamente, primeira e segunda linha para o tratamento farmacológico da DC (Romero; Morilla, 2010). São os únicos fármacos aprovados para o tratamento até o presente momento, uma vez que são os que apresentam melhor eficácia contra a DC (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010; Peron *et al.*, 2017; Pinheiro *et al.*, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018). O BZN é preferido em relação ao NFX uma vez que apresenta melhor tolerabilidade, maior penetração nos tecidos, maiores eficácia e segurança (Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010; Pérez-Molina; Molina, 2018).

O NFX e o BZN apresentam taxas de cura parasitológica acima de 80% na fase aguda, entretanto a eficácia é variável em diferentes países, provavelmente devido a diferentes sensibilidades aos fármacos apresentadas por diferentes cepas de *T. cruzi* (Docampo, 2011; Morilla; Romero, 2015). Algumas cepas do parasita são naturalmente resistentes a compostos nitroheterocíclicos, podendo ser resistente a ambos, BZN e NFX, o que parece estar relacionado às bombas de efluxo da glicoproteína-P. Estes fármacos são melhor tolerados por crianças e altamente tóxicos em adultos, entretanto as razões para essa diferença ainda não foram esclarecidas (Altcheh *et al.*, 2011; Bermudez *et al.*, 2016). Além disso, ambos os fármacos apresentam baixa eficácia na fase crônica tardia da doença (Docampo, 2011). A razão para essa diferença na eficácia não está clara, mas parece estar relacionada com propriedades

farmacocinéticas não favoráveis, como tempo de meia-vida relativamente curto e penetração tecidual limitada, que limitam a atividade na fase crônica, uma vez que nesta fase o parasita está localizado no interior das células (Urbina, 2010).

O NFX foi o primeiro medicamento a ser proposto para o tratamento da DC com o nome de Lampit®. Atualmente é produzido e utilizado predominantemente na América Central, não sendo mais comercializado no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai (Coura, 2009). Este fármaco está disponível na forma de comprimidos de 120 mg administrados por via oral, em três doses no total de 8-10 mg/kg/dia em adultos e 15 mg/kg/dia em crianças, durante 60 a 90 dias. Os melhores resultados foram obtidos em crianças na fase aguda da doença e a eficácia em pacientes adultos na fase crônica é baixa (Mady; Ianni; Jr, 2008; Sales Junior *et al.*, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018).

O tratamento com NFX, mesmo em doses baixas, apresenta efeitos colaterais mais graves que o tratamento com BZN. Os efeitos adversos mais observados são: anorexia, perda de peso, parestesia, sonolência ou excitabilidade psíquica e sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos e cólicas intestinais ocasionais (Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017; Sales Junior *et al.*, 2017). Este perfil de toxicidade é responsável pela interrupção do tratamento em até 40% dos pacientes que recebem NFX (Molina *et al.*, 2015; Crespillo-Andújar *et al.*, 2018). Tanto o NFX quanto o BZN são contraindicados em casos de gravidez, insuficiência hepática, insuficiência renal, doenças neurológicas não relacionadas à DC e outras doenças que possam ser agravadas pelo tratamento, dado seu perfil de toxicidade (Mady; Ianni; Jr, 2008; Coura, 2009).

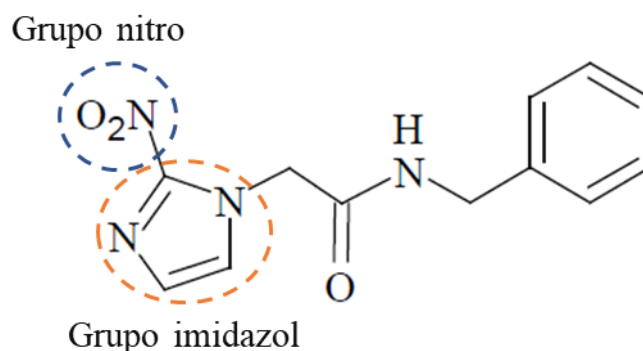
Por fim, outros fármacos foram propostos como alternativas ao BZN e NFX, como os inibidores do ergosterol itraconazol, posaconazol, ravuconazol e voriconazol. Ainda que eles tenham apresentado atividade *in vitro* e *in vivo* promissora contra o *T. cruzi*, os ensaios clínicos demonstraram maior falha terapêutica e/ou menor eficácia em comparação ao BZN (Zingales *et al.*, 2014; Morilla; Romero, 2015; Carvalho; Goldenberg; Campos De Carvalho, 2017; Sales Junior *et al.*, 2017).

### **2.2.1 Benznidazol**

O BZN (N-benzil-2-nitro-1-imidazol-acetamida) é um derivado nitroimidazólico (Figura 5) com atividade antiprotozoária (Ferraz *et al.*, 2018). Este fármaco foi lançado em 1971 pelo laboratório Roche, que deteve a sua patente até 2003, quando a licença e a tecnologia foram transferidas para o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE).

Atualmente, o medicamento produzido no Brasil pela LAFEPE é chamado Benznidazol LAFEPE® e o produzido na Argentina pela ELEA, uma companhia farmacêutica local, é conhecido como Abarax® (Molina *et al.*, 2015; Alpern; Lopez-Velez; Stauffer, 2017).

**Figura 5 - Estrutura química do benznidazol.**



Fonte: Adaptado de Brasil, 2010.

O BZN é um pó cristalino, levemente amarelado, inodoro, insípido e estável ao ar. Apresenta massa molar de 260,25 g/mol e faixa de fusão de 188 a 190°C. A solubilidade do BZN, em termos descritivos, está apresentada na tabela 1. A solubilidade aquosa deste fármaco é baixa, com valores entre 0,2 mg/mL (Maximiano; Costa; Souza, 2010) e 0,4 mg/mL (Lamas *et al.*, 2006).

**Tabela 1 - Solubilidade do BZN**

Termo descritivo	Solvente
Muito solúvel	Dimetilsulfóxido
Facilmente solúvel	Dimetilformamida
Solúvel	Hexano
Ligeiramente solúvel	Etanol, metanol, acetato de etila e cloreto de metileno
Pouco solúvel	Acetona
Muito pouco solúvel	Água, clorofórmio, álcool isopropílico e glicerol, hidróxido de sódio 0,1M e ácido clorídrico 0,1M
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Éter de petróleo

Fonte: Brasil, 2010

O BZN apresenta coeficiente de partição (log P) teórico de 1,64 (Chemicalize, 2018) e um log P experimental em torno de 0,7 (Maximiano; Costa; Souza, 2010). Foi incluído por

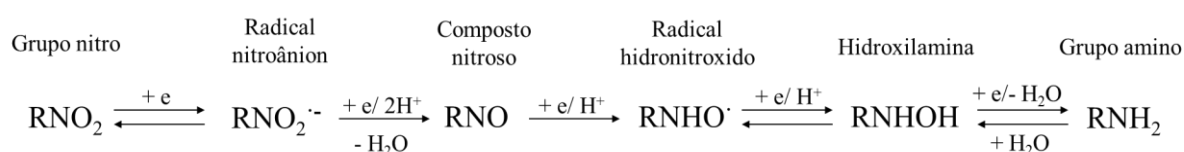
alguns autores no grupo III da classificação biofarmacêutica, ou seja, fármacos com alta solubilidade e baixa permeabilidade (Kasim *et al.*, 2004; Morilla; Romero, 2015). Porém, considerando os valores de solubilidade e coeficiente de partição, este fármaco poderia ser incluído no grupo IV da classificação biofarmacêutica, devido à sua baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade ( $\log P < 1,7$ ) (Maximiano; Costa; Souza, 2010; Del Moral Sanchez *et al.*, 2018).

A baixa solubilidade aquosa e consequente absorção oral irregular são fatores fundamentais para a diminuição de resultados satisfatórios do tratamento (Morilla *et al.*, 2002). O BZN é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, alcançando a concentração plasmática máxima em 3-4h. Sua excreção é predominantemente renal e apresenta tempo de meia-vida de 12h (Mady; Ianni; Jr, 2008). Se 40% do fármaco estiver ligado a proteínas plasmáticas, apresenta um volume de distribuição aparente de 0,56 L/kg. Este baixo volume de distribuição indica uma baixa tendência do fármaco para penetrar nos tecidos, tendendo a permanecer no compartimento vascular. Além disso, o BZN sofre extensiva metabolização intracelular no hospedeiro, o que resulta em metabólitos tóxicos (Morilla; Romero, 2015).

O metabolismo hepático do BZN parece estar relacionado com a formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos (Figura 6). O grupo nitro ( $\text{NO}_2$ ) presente em sua molécula é reduzido ao grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) pela ação de enzimas nitrorredutases, com a formação de vários radicais livres como produtos intermediários e metabólitos eletrofílicos. Este processo tem início com a reação catalisada pela NADPH-citocromo P450 redutase, levando à formação de um radical nitro como intermediário ( $\text{R-NO}_2^\cdot$ ) e subsequente formação de hidroxilamina ( $\text{R-NHOH}$ ). O radical nitro formado pelo BZN estaria envolvido com seu efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi*, como DNA e citocromo P450 (Castro; De Mecca; Bartel, 2006; Dias; Dessoy, 2009).

É descrito ainda que o BZN aumenta a fagocitose e lisa o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon  $\gamma$  e há indicativos que ele inibe o crescimento do tripanossomo através da enzima NADH-fumarato redutase (Maya *et al.*, 2007).

**Figura 6 - Representação esquemática da via metabólica proposta para o benznidazol.**



Fonte: Adaptado de Castro; De Mecca; Bartel, 2006.

Os metabólitos eletrofílicos do BZN podem atuar também em outros sistemas no hospedeiro humano devido a sua alta reatividade. Acredita-se que a toxicidade do fármaco seja devido à interação de seus metabólitos reativos com o DNA, proteínas, lipídios ou outro componente celular relevante. Esse mecanismo pode estar envolvido não só nos efeitos tóxicos no hospedeiro mamífero como também nas ações deletérias no *T. cruzi*, sendo responsável por suas ações quimioterápicas (Castro; De Mecca; Bartel, 2006; Dias; Dessoy, 2009).

A eficácia e tolerância do BZN podem ser inversamente relacionadas com a idade do paciente e os efeitos adversos são mais frequentes em pacientes idosos. Reações adversas ocorrem em cerca de 50 % dos pacientes adultos tratados com BZN e, devido a isso, mais de 20% dos pacientes interrompem o tratamento. Os efeitos adversos mais comuns são aquelas relacionados com a hipersensibilidade, tais como a dermatite (20 a 25%) e a intolerância gastrointestinal (aproximadamente 5%). Sintomas gerais temporários e que necessariamente não causam interrupção da terapia, como anorexia, astenia, dor de cabeça e distúrbios de sono, estão presentes em até 40% dos pacientes. A neuropatia é presente em quase um terço dos pacientes, mas para apenas uma pequena porcentagem destes pacientes representa um problema clínico relevante. Depressão da medula óssea é outro importante efeito secundário que pode ser manifestado como neutropenia, agranulocitose ou trombocitopenia (Viotti *et al.*, 2009; Altchek *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2015).

Até 2011, o BZN estava disponível apenas em comprimidos de 100 mg. Para o tratamento de crianças e recém-nascidos era necessário o fracionamento do comprimido, o que sempre pode resultar em doses inadequadas. Com o objetivo de resolver esse problema, entre 2011 e 2012, uma nova formulação de BZN na forma de comprimidos dispersíveis de 12,5 mg, foi desenvolvido através dos esforços conjuntos da Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas (DNDi) e do LAFEPE. O comprimido pediátrico de 12,5 mg foi registrado no Brasil e atualmente está presente na relação de medicamentos essenciais para crianças da Organização Mundial de Saúde. Além disso, o Abarax<sup>®</sup> 50 mg está disponível como comprimido de desintegração oral duplamente marcado em sulcos (Morilla; Romero, 2015; Davanço *et al.*, 2016).

Nenhum tratamento disponível até o momento é satisfatório e as terapias baseadas no BZN não têm conseguido uma cura parasitológica satisfatória na fase crônica (Morilla *et al.*, 2003; Romero; Morilla, 2010). Assim, os principais desafios para a farmacoterapia da DC são: atingir as formas amastigotas e, em consequência, obter a cura farmacológica na fase crônica; reduzir a frequência de administração com o objetivo de aumentar a complacência e

a adesão ao tratamento e utilizar doses mais baixas dos fármacos disponíveis para prevenir efeitos adversos (Romero; Morilla, 2010).

### 2.3 Alternativas para melhorar a biodisponibilidade do benznidazol

A baixa solubilidade em água do BZN leva a absorção oral irregular e promove uma farmacocinética desfavorável. Deste modo, estratégias para melhorar a dissolução do BZN são de grande interesse (Maximiano *et al.*, 2011a).

Uma das primeiras propostas para a melhoria da dissolução foi a incorporação do BZN em micropartículas de quitosana. Os parâmetros de processo foram otimizados utilizando redes neurais artificiais e a formulação de escolha continha 1,5 % de quitosana e 6,0 % do agente coacervante (solução de NaOH). A análise do perfil de dissolução do fármaco mostrou que as micropartículas de BZN em quitosana apresentaram maior velocidade de dissolução, com 98,5% do BZN dissolvido após 30 minutos quando comparado a 48,5% do fármaco livre, demonstrando que as micropartículas constituem sistemas de liberação rápida (Leonardi *et al.*, 2009).

Microcristais de BZN obtidos pelo método de precipitação por mudança de solvente foram produzidos por Maximiano e colaboradores (2011b), bem como comprimidos a partir deste fármaco. Observou-se aumento na dissolução do BZN na forma micronizada ( $66,6 \pm 0,3\%$ ) e nos comprimidos produzidos com estas partículas ( $75,3 \pm 0,6\%$ ), em comparação com o BZN na forma original ( $20,7 \pm 2,3\%$ ) e com o comprimido comercial ( $31,1 \pm 5,1\%$ ) após 20 minutos. Os estudos *in vivo* em modelo murino mostraram aumento na eficácia terapêutica com comprimidos produzidos a partir dos microcristais, com 100% de redução na parasitemia na dose de 50 mg/kg/dia de BZN, enquanto que o comprimido comercial não apresentou redução na parasitemia nesta dosagem.

Com o mesmo objetivo de melhorar a dissolução do BZN, diversos autores propuseram a sua complexação com ciclodextrinas (CD). Sobrinho e colaboradores (2011) propuseram a formação de complexos de inclusão com três CD naturais ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD) e três derivados da  $\beta$ CD (hidroxipropil- $\beta$ CD, metil- $\beta$ CD e sulfobutil éter- $\beta$ CD). Todos os complexos de inclusão aumentaram a solubilidade do BZN, sendo que a quantidade de fármaco dissolvido após 20 minutos aumentou até quase seis vezes, de  $14,2 \pm 1,3\%$  para o BZN livre para  $87,6 \pm 1,8\%$  para o BZN complexado com metil- $\beta$ CD.

Comprimidos efervescentes contendo BZN complexado com hidroxipropil- $\beta$ CD foram desenvolvidos por Maximiano e colaboradores (2011a). A complexação com CD resultou em aumento de quase 20 vezes na solubilidade aquosa do fármaco. Em 15 minutos, cerca de 90 mg de BZN do comprimido efervescente contendo CD encontrou-se dissolvida, comparado a cerca de 30 mg no comprimido comercial. Segundo os autores, a efervescência promoveu um efeito sinérgico à complexação com CD.

Soares-Sobrinho *et al.* (2012) desenvolveram sistemas binários de BZN e metil- $\beta$ CD e sistemas ternários de BZN, metil- $\beta$ CD e polímeros hidrofílicos (hidroxipropilmetilcelulose e polivinilpirrolidona). Após 60 min, a porcentagem de fármaco dissolvido foi maior que 90% a partir de ambos os sistemas (binário e ternário) e 30% para o BZN livre. Isto indica que a presença dos polímeros não resultou em melhorias no perfil de dissolução em relação aos sistemas binários.

A inclusão do BZN em dispersões sólidas também tem sido considerada por alguns autores como alternativa para melhorar a sua dissolução. Assim, Leonardi e Salomon (2013) desenvolveram comprimidos de BZN a partir de dispersões sólidas entre o fármaco e polietilenoglicol 6000. A dissolução do BZN aumentou de 73% (forma livre) para 85%, após 60 minutos, com o uso da dispersão sólida na proporção de 1:1.

Dispersões sólidas de BZN e desoxicolato de sódio ou hidroxipropilcelulose pouco substituída (L-HPC) em diferentes proporções foram desenvolvidas por Palmeiro-Roldán e colaboradores (2014) e por Fonseca-Berzal e colaboradores (2015b), respectivamente. Os melhores resultados foram alcançados com a dispersão sólida entre BZN e L-HPC na razão 1:3 (p/p), em que a dissolução do BZN aumentou de 23% para 85% após 5 minutos com a dispersão sólida. Além disso, a dispersão sólida promoveu redução na parasitemia de 60%, contra 33% do fármaco livre, em modelos murinos de DC tratados por cinco dias na dose de 25 mg/kg/dia de BZN.

Nanopartículas (nanocristais) de BZN (BZN-nps) foram desenvolvidas por Scalise e colaboradores (2016) e avaliadas quanto à eficácia *in vitro* (formas tripomastigotas e amastigotas da cepa Nicarágua) e *in vivo* (modelo murino de infecção aguda). Valores de IC<sub>50</sub> de 36  $\mu$ g/mL e 49  $\mu$ g/mL foram encontrados para as formas tripomastigotas tratadas, respectivamente, com BZN-nps e o fármaco livre. Não houve diferenças significativas na inibição do crescimento de amastigotas tratadas com BZN-nps e o fármaco livre. Os camundongos tratados com BZN-nps e com o fármaco livre apresentaram 100% de sobrevivência enquanto que apenas 15% dos animais não tratados sobreviveram após 30 dias de tratamento.



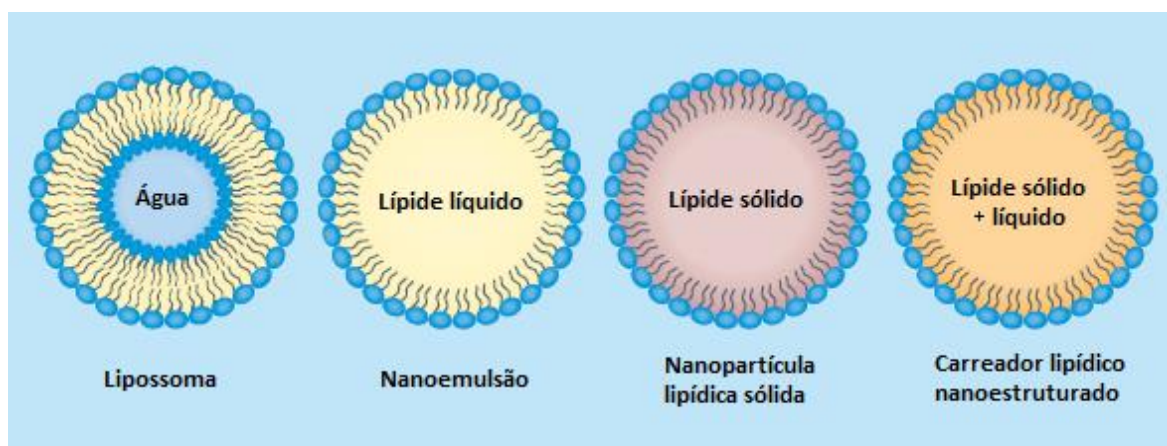
## 2.4 Sistemas lipídicos nanoestruturados

A utilização da nanotecnologia no desenvolvimento de novos medicamentos pode resultar em aumento da eficácia e diminuição da toxicidade de fármacos (Khalil *et al.*, 2013; Streck *et al.*, 2016). O interesse no desenvolvimento de nanossistemas para o tratamento de doenças negligenciadas está relacionado a possibilidade de liberação prolongada que poderia diminuir a dose utilizada na terapêutica e sua frequência, reduzindo com isso a toxicidade associada (Durán *et al.*, 2009).

Na DC, o desafio farmacoterapêutico está no desenvolvimento de fármacos e/ou sistemas de liberação de fármacos que eliminem os parasitas intracelulares, apresentando assim, maior eficácia na fase crônica. As membranas biológicas e o complexo microambiente celular impedem o acesso dos fármacos aos ninhos de amastigotas. Como o parasita encontra-se distribuído em várias partes do corpo, são necessárias altas doses de fármacos, o que traz muitos efeitos adversos como consequência do tratamento (Khalil *et al.*, 2013; Streck *et al.*, 2016). Uma das possibilidades para promover o direcionamento para as células infectadas, maior captação do fármaco por elas e com isso maior eficácia e menor toxicidade seria a associação dos fármacos utilizados aos sistemas lipídicos nanoestruturados (Streck *et al.*, 2016).

Há diversas formas de nanocarreadores lipídicos (Figura 7), incluindo lipossomas, nanoemulsões (NE), microemulsões (ME), nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Sistemas de liberação de fármacos baseados em lipídeos são promissores porque apresentam grande potencial para aumentar a solubilidade e melhorar a biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água (Gaba *et al.*, 2014).

**Figura 7 – Principais tipos de sistemas lipídicos para liberação de fármacos.**



Fonte: Adaptado de Poonia *et al.*, 2016.

Estes sistemas costumam ter seu uso tolerado por diversas vias de administração apresentando, em geral, baixa toxicidade quando comparado com sistemas de outras composições, como algumas nanopartículas poliméricas, por exemplo. Isto se deve ao fato de serem utilizados lípides fisiológicos em sua composição, os quais são biocompatíveis e biodegradáveis, além de excipientes geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Heurtault *et al.*, 2003; Negi; Jaggi; Talegaonkar, 2014; Ganesan; Narayanasamy, 2017).

#### **2.4.1 Lipossomas**

Uma das primeiras e mais aplicadas tecnologias de carreamento de fármacos são os lipossomas (Danaei *et al.*, 2018). Este nanossistema foi desenvolvido na década de 70 e utilizado para encapsular fármacos lipofílicos e hidrofílicos (Durán *et al.*, 2009). Os lipossomas são vesículas microscópicas constituídas por uma ou mais esferas concêntricas de bicamadas lipídicas separadas por compartimentos aquosos, com diâmetro variando de 80 nm a 100 µm (Date; Joshi; Patravale, 2007). As bicamadas lipídicas são compostas principalmente por fosfolípidios e colesterol (Niu *et al.*, 2016). Peptídeos (antígenos), polímeros, antioxidantes (por exemplo, tocoferol) também podem ser incluídos na estrutura dos lipossomas com o propósito de auxiliar no direcionamento da vesícula lipídica ou melhorar sua estabilidade e a validade do produto (Danaei *et al.*, 2018).

Dentre as vantagens apresentadas, estão a proteção do fármaco contra a degradação enzimática, baixa toxicidade, flexibilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-imunogenicidade, a capacidade de transportar grandes quantidades de fármaco e a possibilidade de modificação de suas características físico-químicas a fim de controlar seu comportamento biológico (Sercombe *et al.*, 2015). Os lipossomas têm sido utilizados para estabilizar fármacos, contornar barreiras para absorção celular e tecidual, e direcionamento do seu conteúdo para locais específicos (Hua; Wu, 2013). Apesar dessas vantagens, lipossomas convencionais tem suas aplicações limitadas devido ao curto prazo de validade, pouca estabilidade, baixa eficiência de encapsulação e rápida remoção pelo sistema reticuloendotelial (Naseri; Valizadeh; Zakeri-Milani, 2015).

#### **2.4.2 Microemulsões e nanoemulsões**

As emulsões são sistemas heterogêneos nos quais um líquido imiscível (geralmente óleos e outros lípidos) é disperso na forma de gotículas em outro líquido (geralmente a água ou

tampões). Tal sistema é estabilizado cineticamente através da adição de um terceiro componente ou mistura de componentes com propriedades emulsificantes (Benita; Levy, 1993). Quando as emulsões consistem de uma dispersão coloidal de gotículas, com tamanho na escala nanométrica, normalmente na faixa de 20-200 nm, podem ser de dois tipos as NE e as ME. As NE também são referidas na literatura como miniemulsões, emulsões submicrométricas, emulsões ultrafinas, dentre outras denominações (Solans *et al.*, 2005).

Enquanto emulsões convencionais apresentam certa estabilidade cinética, elas são termodinamicamente instáveis e, eventualmente, pode ocorrer separação de fases. Entretanto, as NE são consideradas instáveis termodinamicamente e estáveis cineticamente (Patel; Joshi, 2012). As ME, por sua vez, são termodinamicamente estáveis, sendo essa a principal diferença em relação as NE. Devido a essa diferença na estabilidade termodinâmica desses sistemas lipídicos, há a necessidade de fornecimento de maior quantidade de energia para formar a NE em comparação com as ME (Nastiti *et al.*, 2017).

Algumas diferenças estruturais também podem ser utilizadas para distinguir os dois sistemas. As NE tendem a ser esféricas enquanto as ME podem ser esféricas ou não esféricas (estruturas lamelares, por exemplo) dependendo da razão tensoativo/óleo (McClements, 2012). A morfologia (tipo e tamanho) das ME é fortemente afetada por mudanças de temperatura e/ou diluição, podendo ocorrer quebra da emulsão, enquanto as NE permanecem estáveis nestas condições de estresse físico (Anton; Vandamme, 2011). As similaridades e diferenças entre as emulsões convencionais, microemulsões e nanoemulsões são sumarizadas na tabela 2.

**Tabela 2 - Propriedades das emulsões, microemulsões e nanoemulsões**

Propriedade	Emulsão	Microemulsão	Nanoemulsão
Descrição física	Dispersão grosseira	Dispersão coloidal	Dispersão coloidal
Tamanho de partícula	>500 nm	<200 nm	<200 nm
Polidispersividade	Alta	Baixa	Baixa
Estabilidade termodinâmica	Instável	Estável	Instável
Preparo	Alta energia	Baixa energia	Baixa/alta energia
Razão tensoativo/óleo	Baixa	Alta	Moderada
Aparência física	Opaco	Translúcido	Translúcido

Fonte: Adaptado de Nastiti *et al.*, 2017.

As ME e as NE têm sido utilizadas como carreadores de fármacos lipofílicos, para estabilização de compostos suscetíveis a hidrólise e redução da irritação ou toxicidade do

fármaco. Além disso, as NE têm sido utilizadas como sistema de liberação sustentada através da formação de depósitos após injeção subcutânea e como sistema de liberação de fármaco sítio-específico por meio da interação de ligantes utilizados na superfície do glóbulo com receptores da superfície celular (Santos-Magalhaes *et al.*, 2000).

As NE aumentam a biodisponibilidade de fármacos sem serem tóxicas ou irritantes e por isso podem ser facilmente aplicadas sobre a pele e mucosas, ou mesmo injetadas por via parenteral, desde que sejam formuladas com tensoativos adequados para esta via. Assim, geralmente não danificam células humanas saudáveis e são consideradas adequadas para fins terapêuticos em diversos casos (Shah; Bhalodia; Shelat, 2010; Jaiswal; Dudhe; Sharma, 2014). As ME não são adequadas para a administração parenteral devido à sua instabilidade quando diluídas (Silva *et al.*, 2015). A principal limitação a ser contornada é a estabilidade física, podendo ocorrer aglomeração, expulsão do fármaco ou eventualmente quebra da emulsão em alguns casos (Singhal *et al.*, 2011).

#### **2.4.3 Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados**

Dois tipos de nanopartículas lipídicas com matriz sólida têm sido utilizadas para carregamento de fármacos pouco solúveis em água, as NLS e os CLN. Essas partículas podem ser amplamente aplicadas para liberação de fármacos por meio de vias oral, parenteral, tópica, ocular e pulmonar (Corrias; Lai, 2011; Das; Ng; Tan, 2012).

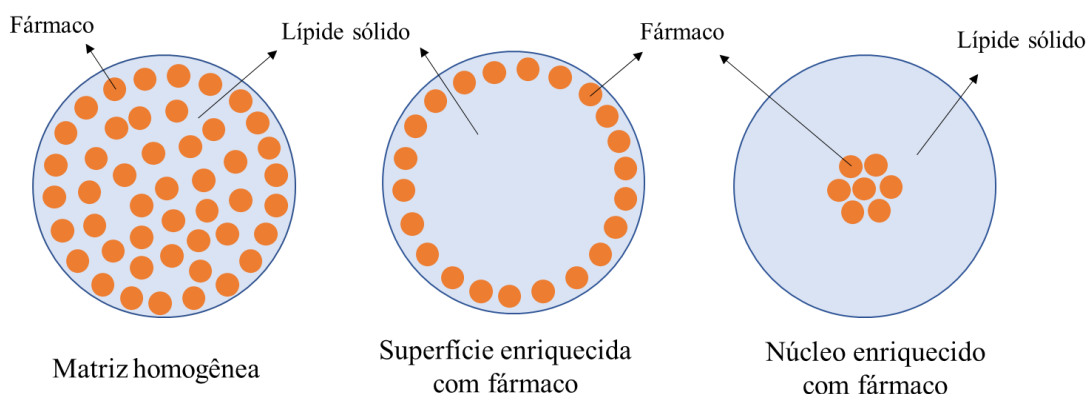
As NLS são nanossistemas derivados de emulsões para nutrição parenteral apenas pela substituição do lípide líquido (óleo) por um lípide sólido e apresentam diâmetro médio entre 50 e 1000 nm (Müller; Mäder; Gohla, 2000; Wang; Liu; Huang, 2018). Estes nanossistemas também promovem proteção do princípio ativo contra a degradação química associado a maior flexibilidade na modulação da liberação do composto, além de serem constituídas por excipientes bem tolerados e poderem ser facilmente produzidas em larga escala (Müller; Radtke; Wissing, 2002). Outras vantagens são o fato de evitar o uso de solventes orgânicos durante a produção e a alta estabilidade *in vivo*, uma vez que permanecem sólidas mesmo na temperatura corporal (Beloqui *et al.*, 2016).

Por outro lado, a limitação na capacidade de carregamento de fármacos devido a estrutura cristalina do lípide sólido é uma grande desvantagem, bem como a expulsão do fármaco encapsulado durante o armazenamento. Isso ocorre especialmente quando as NLS são preparadas a partir de lípides altamente purificados e de composição mais simples, como triestearina ou trimiristina. Durante o período de prateleira, também podem ocorrer

crescimento das partículas por aglomeração e até mesmo gelatinização (Das; Chaudhury, 2011).

A liberação do fármaco a partir da matriz sólida é dependente do tipo de matriz e da localização do fármaco na matriz. Assim, considerando a distribuição do fármaco na matriz sólida, tem-se três tipos diferentes de nanopartículas lipídicas (Figura 8): matriz homogênea, superfície enriquecida com fármaco e núcleo enriquecido com fármaco (Ghasemiyeh; Mohammadi-Samani, 2018). No modelo de matriz homogênea, o fármaco encontra-se disperso ou presente em aglomerados amorfos na matriz lipídica. O tipo superfície enriquecido com fármaco contém um invólucro exterior enriquecido com fármaco que cobre um núcleo lipídico. E o terceiro tipo, o núcleo enriquecido com fármaco, forma-se quando o fármaco começa a precipitar antes do lipídeo e a camada lipídica se forma ao redor do núcleo de fármaco (Muchow; Maincent; Müller, 2008; Battaglia; Gallarate, 2012).

**Figura 8 - Tipos de nanopartículas lipídicas sólidas considerando a distribuição de fármaco.**



A composição geral das NLS inclui lípides sólidos como, por exemplo, triglicerídeos, glicerídeos parciais, ácidos graxos, esteroides ou ceras, estabilizados por emulsificantes fisiologicamente compatíveis como os fosfolípides, sais biliares, polissorbato, éteres de polioxietileno ou álcoois polivinílicos, além de água (Corrias; Lai, 2011). Todas as classes de tensoativos, no que diz respeito à carga e peso molecular, podem ser utilizadas para estabilizar a dispersão de lípides e uma combinação eficiente destes agentes pode impedir a aglomeração das partículas, como o uso de substâncias carregadas positiva ou negativamente, por exemplo. A escolha do tensoativo irá depender da via de administração, sendo mais limitada para administrações parenterais (Mehnert; Mäder, 2001).

A capacidade de carregamento do fármaco nas NLS convencionais é limitada pela solubilidade do fármaco na matriz lipídica, pela estrutura e pelo estado polimórfico da matriz lipídica, geralmente representando cerca de 25% de fármaco em relação ao conteúdo lipídico da matriz. Essa quantidade fica ainda mais limitada no caso da matriz ser constituída por moléculas semelhantes, como triglicerídeos contendo apenas um tipo de ácido graxo na cadeia lateral (como triestearina ou tripalmitina, por exemplo), sendo que neste caso um cristal quase perfeito é formado. Como os fármacos incorporados estão localizados entre as cadeias de ácido graxo, especialmente em potenciais imperfeições do cristal, uma rede cristalina altamente ordenada não pode acomodar grandes quantidades de fármaco. Deste modo, a utilização de mistura de lípides, como mono, di e triglicerídeos com cadeias de diferentes tamanhos, induz a produção de NLS com capacidade de carregamento de fármaco mais elevada (Wissing; Kayser; Müller, 2004).

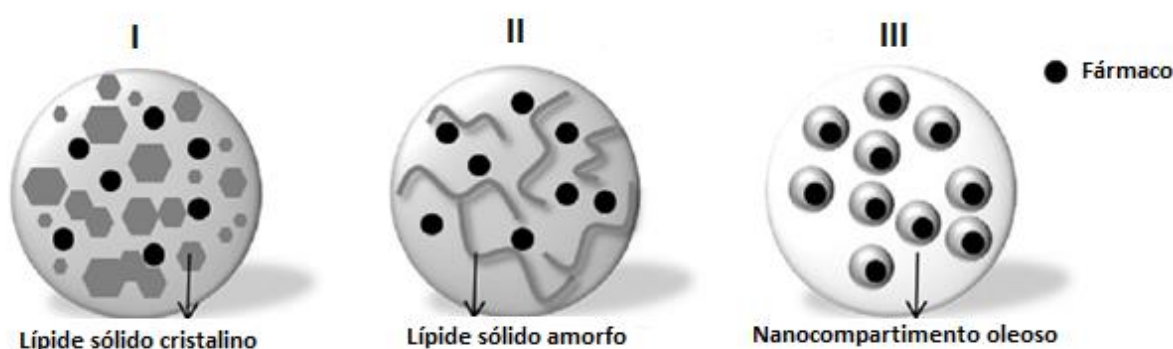
Os lípides utilizados nas formulações apresentam ainda diferentes formas polimórficas, sendo as formas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\beta'$  as principais. A forma  $\beta$  é a mais estável, o polimorfo  $\beta'$  é considerado metaestável, enquanto a forma  $\alpha$  é a mais instável. Durante processo de preparo, o lípido cristaliza em seu polimorfo imperfeito e mais instável ( $\alpha$ ), que durante a estocagem é convertido para a forma metaestável ( $\beta'$ ) e finalmente para  $\beta$ , mais estável. Os polimorfos mais estáveis apresentam estrutura mais perfeita e organizada quando comparado com o polimorfo  $\alpha$ . Estas transições polimórficas podem também levar à expulsão do fármaco antes incorporado nas imperfeições da matriz lipídica (Heurtault *et al.*, 2003; Negi; Jaggi; Talegaonkar, 2014).

Com o objetivo de contornar a baixa capacidade de carregamento das NLS e a expulsão do fármaco durante o armazenamento, foram propostos os CLN, que são um sistema de liberação promissor para fármacos pouco solúveis em água. Os CLN são estruturas coloidais compostas por um núcleo contendo uma mistura de lípides sólidos e líquidos, o que torna a matriz lipídica mais desestruturada e com mais imperfeições para acomodar o fármaco do que as NLS. Apesar da presença de lípides líquidos, a matriz dos CLN é sólida tanto em temperatura ambiente quanto corporal (Das; Ng; Tan, 2012; Beloqui *et al.*, 2017).

Considerando a estrutura da matriz lipídica, os CLN podem ser classificados em três tipos (Figura 9): imperfeito (I), amorfo ou sem estrutura (II) e múltiplo (III). No tipo I, lípides sólidos e pequenas quantidades de óleos são misturados e as diferenças nas estruturas dos lípides tornam a matriz imperfeita e desordenada, oferecendo espaços para acomodar as moléculas de fármacos. No tipo II, com ainda maior quantidade de óleos, os lípides são misturados de forma a evitar a cristalização e com isso a expulsão do fármaco; a matriz lipídica é sólida, mas não cristalina. O tipo III apresenta um alto conteúdo de lípides líquidos, que

formam minúsculos compartimentos oleosos no qual o fármaco pode encontrar-se disperso. A composição e estrutura dos CLN permite maior incorporação de fármacos pela formação de matriz lipídica menos ordenada, melhorando as propriedades de liberação e aumentando a estabilidade durante o armazenamento (Radtke; Souto; Müller, 2005; Battaglia; Gallarate, 2012; Belouqui *et al.*, 2017).

**Figura 9 -Tipos de CLN dependendo da estrutura da matriz lipídica.**



Fonte: Adaptado de Belouqui *et al.*, 2017.

Diante das vantagens expostas e das potenciais aplicações dos sistemas lipídicos, estes podem ser carreadores interessantes para fármacos pouco solúveis em água como o BZN, podendo melhorar suas propriedades farmacocinéticas desfavoráveis.

#### **2.4.4 Sistemas lipídicos nanoestruturados contendo benznidazol**

O grupo de Morilla e colaboradores propôs a encapsulação de BZN em lipossomas multilamelares compostos por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, diestearoilfosfatidilglicerol e colesterol, na razão fármaco/lípides totais de 0,7%. Após administração por via parenteral em ratos Wistar na dose de 0,2 mg/Kg de BZN, foi observado direcionamento do fármaco para células de Kupffer no fígado. Apesar disso, não houve uma maior redução nos níveis de parasitemia nos camundongos infectados quando comparado ao fármaco livre. O BZN lipossomal apresentou menor percentual de ligação a proteínas plasmáticas e foi eliminado da corrente sanguínea mais rapidamente devido ao direcionamento hepático do que quando administrado na forma de solução em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), a fase externa do lipossoma. Com isso, espera-se que os efeitos adversos associados sejam menores (Morilla *et al.*, 2004; Morilla; Prieto; Romero, 2005).

Nanoemulsões de óleo de soja e tensoativos (polissorbato 80 e monooleato de sorbitano) em diferentes proporções, na ausência e na presença de co-tensoativos (álcool benzílico e 2-metilpirrolidona) e contendo BZN foram desenvolvidas por Streck e colaboradores (2014). A formulação considerada otimizada foi composta por 10% de óleo de soja, 5% de mistura de tensoativos e 2,5% de 2-metilpirrolidona. Esta formulação apresentou um tamanho de gotícula de  $46 \pm 1$  nm, índice de polidispersão de  $0,29 \pm 0,01$  e uma razão fármaco/matriz lipídica de 0,47%, que representa uma concentração nominal de 0,7 mg/mL de BZN. A toxicidade da formulação e atividade contra o *T. cruzi* não foram avaliadas.

Outra proposta de Streck e colaboradores (2016) foi a veiculação de BZN em ME. Para isto, otimizaram o tipo de tensoativo, a proporção tensoativo/óleo e a razão óleo/água em sistemas lipídicos produzidos pelo método de inversão de fases. A matriz composta por triglicerídeos de cadeia média foi estabilizada por uma mistura de tensoativos constituída por fosfatidilcolina de soja e oleato de sódio (1:7), sendo a dispersão feita em água. ME foram obtidas com relação tensoativo/óleo na faixa de 2,0 a 2,5% (p/p) e 10% de óleo. A maior razão fármaco/lípide foi de 0,67%, equivalente a concentração nominal de 2,34 mg/mL de BZN, que foi alcançada com relação tensoativo/óleo de 2,5%. Além disso, esta formulação apresentou toxicidade em células Vero (epitélio renal de macacos) a partir de 20 µg/mL de BZN, sendo altamente tóxica (cerca de 10% de viabilidade celular) na maior concentração testada (80 µg/mL de BZN).

Apesar das vantagens inerentes aos sistemas lipídicos nanoestruturados, até o momento apenas os três nanossistemas lipídicos apresentados acima foram propostos para veicular o BZN e todos apresentaram razão fármaco/lípide baixa. Assim, considerando que a terapia disponível para a DC permanece insatisfatória devido às limitações apresentadas e que os CLN apresentam alta capacidade de carregamento de fármaco, os CLN contendo BZN representariam uma alternativa promissora para reduzir a toxicidade e aumentar a eficácia do tratamento da DC.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados contendo benznidazol e avaliar sua eficácia tripanocida *in vitro*, voltado para aplicação no tratamento da Doença de Chagas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os nanocarreadores quanto ao diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação;
- Avaliar a interação da matriz lipídica com o BZN utilizando espectrofotometria de absorção molecular na região do infravermelho;
- Analisar o perfil de cristalinidade dos constituintes e da formulação por meio de difração por raios X;
- Investigar o comportamento térmico do BZN, da formulação e seus constituintes por calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria;
- Analisar a morfologia dos nanocarreadores por microscopia eletrônica de varredura;
- Determinar a estabilidade preliminar da formulação;
- Avaliar a toxicidade hemolítica dos carreadores contendo BZN;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* em linhagem celular de fibroblastos murinos (L929);
- Avaliar a eficácia tripanocida *in vitro*, em formas epimastigotas do *T. cruzi*.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

BZN foi obtido a partir da purificação de comprimidos produzidos pela LAFEPE (Recife, Brasil). Compritol® 888 ATO (behenato de glicerila; mistura de mono, di e triglicerídeos do ácido behênico (C22) foi fornecido pela Gattefossé (Lyon, França). Tween® 80 de grau super-refinado (Polissorbato 80; monooleato de sorbitano etoxilado) e Crodamol® GTCC (triglicérides do ácido cáprico e caprílico; triglicérides de cadeia média – TCM) foram cedidos pela Croda Inc (Edison, EUA). O Pluracare® F127 (Poloxamer 407) foi cedido pela Chemspecc (São Paulo, Brasil). Lecitina de ovo (Lipoid® E 80) foi fornecida pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha) e a lecitina de soja foi fornecida pela Cargill (Hamburgo, Alemanha). Glicerol foi obtido da Isofar (Duque de Caxias, Brasil) e tetraidrofurano (THF) de grau analítico foi obtido da Neon (São Paulo, Brasil). Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico.

No estudo de atividade hemolítica foi utilizado um kit de hemácias-teste (Coombs-control IgG – suspensão de hemácias humanas a  $4 \pm 1,0\%$ ) fornecido pela Bio-Rad (Lagoa Santa, Brasil) e saponina fornecida pela INLAB (São Paulo, Brasil). Para os testes *in vitro*, meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640, L-glutamina, penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL), tripsina/EDTA, hemina (10 mg/mL) e MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). O soro fetal bovino (SFB) foi obtido da Gibco® Life Technologies (Carlsbad, EUA). Meio de LIT (*Liver Infusion Tryptose*) foi fornecido pela BD® (New Jersey, EUA).

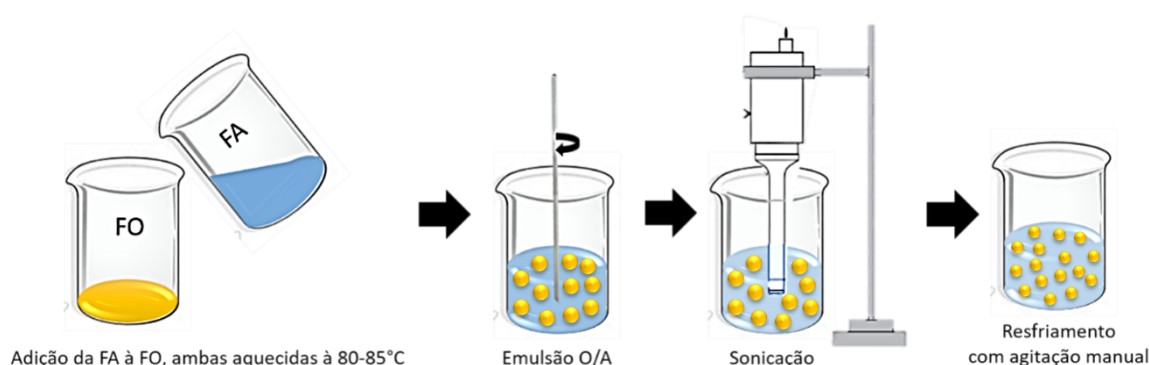
A linhagem celular L929 (fibroblastos de camundongos) foi adquirida da ATCC (Manassas, EUA) e gentilmente cedida pelo Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Ouro Preto. A cepa colombiana de *T. cruzi* foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Doença de Chagas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

### 4.2 Preparo dos CLN

Utilizou-se o método de homogeneização a quente associado à sonicação com sonda de ultrassom como método de preparo dos CLN (Figura 10) (Marcial; Carneiro; Leite, 2017). A fase oleosa (FO) e a fase aquosa (FA) foram pesadas separadamente, o BZN foi previamente

solubilizado na FO fundida e ambas as fases foram aquecidas até 85 °C. A FA foi lentamente vertida sobre a FO sob agitação manual, mantida por 2 minutos. A emulsão formada foi imediatamente submetida à homogeneização com uma sonda de ultrassom de alta intensidade (Q55 sonicador; Qsonica, Church Hill Road, Newton, EUA) durante 10 minutos em amplitude de 40%. Após este tempo, a formulação foi resfriada em banho de água à temperatura ambiente para formação dos CLN. O pH foi ajustado para 7,0 com soluções de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 0,1 M e os produtos obtidos foram armazenados a 4 °C.

**Figura 10 – Representação esquemática do preparo dos CLN.**



#### 4.2.1 Desenvolvimento da formulação de CLN contendo BZN

O desenvolvimento da formulação de CLN contendo BZN leva em consideração a busca pela otimização dos parâmetros de tamanho e potencial zeta dos nanocarreadores, além de máxima incorporação do fármaco no interior do nanossistema. Os métodos para determinação de cada propriedade estão descritos na seção 4.3.

Primeiramente, avaliou-se a influência do lípide líquido (TCM e óleo de soja) e a influência da composição do sistema tensoativo nas características da formulação. Foram propostos Tween<sup>®</sup> 80, poloxamer 407, lecitina de soja e lecitina de ovo como tensoativos. A presença de colesterol como co-tensoativo também foi investigada. Compritol<sup>®</sup> 888 ATO foi utilizado como lípide sólido. O conjunto dos lípides utilizados, tensoativos e co-tensoativos foi considerado como FO. As nanopartículas foram preparadas na forma de uma dispersão na FA composta por uma solução aquosa de glicerol (2,25 %), um isotonzante. A composição dos nanocarreadores está apresentada na tabela 3.

**Tabela 3 - Composição dos CLN (% p/v) contendo BZN 0,05%.**

COMPONENTES	CLN A	CLN B	CLN C	CLN D	CLN E	CLN F	CLN G
Compritol® 888 ATO	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
TCM	0,3	-	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Óleo de soja	-	0,3	-	-	-	-	-
Tween® 80	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	-
Poloxamer 407	-	-	-	-	-	0,5	1,0
Colesterol	-	-	0,15	-	-	-	-
Lecitina de soja	-	-	-	0,5	-	-	-
Lecitina de ovo	-	-	-	-	0,5	-	-

Em seguida, propuseram-se alterações na concentração de lípides, mantendo-se a mesma razão lípide/tensioativo e variações na concentração total do sistema tensioativo (1 e 2%) (Tabela 4).

**Tabela 4 - Variação na concentração de lípides (% p/v) e na composição dos tensoativos utilizados nos CLN contendo BZN 0,05%.**

COMPONENTES	CLN F	CLN H	CLN I	CLN J	CLN K
<b>Lípides</b>					
Compritol® 888 ATO	1,2	2,4	2,4	4,0	4,0
TCM	0,3	0,6	0,6	1,0	1,0
<b>Tensoativos</b>					
Tween® 80	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5
Poloxamer 407	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5

Por fim, mantendo a composição da CLN F, investigou-se a influência da concentração de BZN (0,05, 0,1 e 0,2%, respectivamente CLN F, CLN L e CLN M) sobre a sua encapsulação nos CLN.

### 4.3 Caracterização química e físico-química dos CLN

#### 4.3.1 Determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão

O diâmetro médio e o índice de polidispersão (IP) foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), a 25 °C, em um ângulo de incidência do laser de 173°, utilizando um contador de partículas com raio laser monocromático Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments; Worcestershire, Inglaterra). As formulações foram diluídas 10 vezes na fase externa da formulação previamente à leitura. As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). O valor máximo aceitável para considerar a amostra monodispersa foi IP igual ou inferior a 0,3.

#### 4.3.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta (PZ) foi determinado pela técnica de DLS associado à mobilidade eletroforética utilizando o Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments; Worcestershire, Inglaterra), em ângulo fixo de 173° e temperatura de 25 °C. As formulações foram diluídas 10 vezes na fase externa da formulação previamente à leitura. As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP.

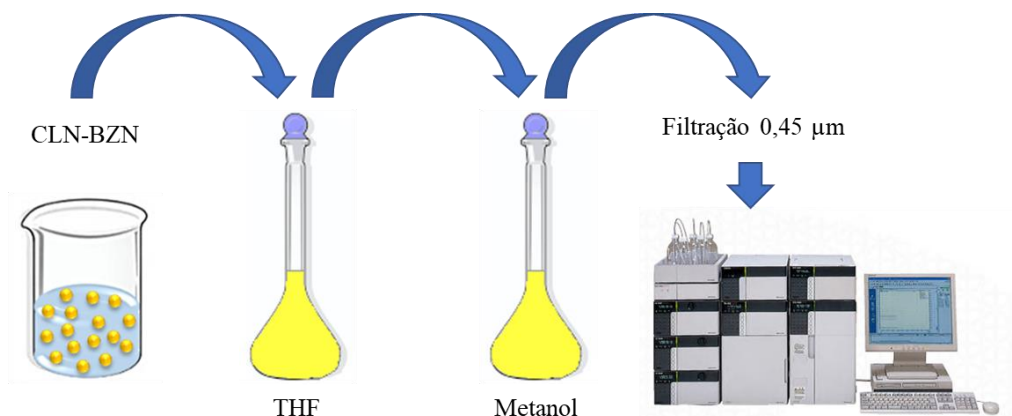
#### 4.3.3 Determinação do teor de encapsulação

A quantificação do BZN na formulação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão) e método analítico previamente desenvolvido e validado (Almeida *et al.*, 2017). As condições cromatográficas empregadas foram: fase móvel isocrática composta por metanol/água (50:50); fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20  $\mu$ L; coluna de fase reversa C18, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m (Sulpelco; Bellefonte, EUA). Todas as análises foram realizadas em temperatura de 25 °C. O equipamento possui detector UV-Vis SPD-20AV no qual as amostras foram avaliadas em comprimento de onda de 316 nm, monitoradas e analisadas utilizando o *software* LabSolution.

Para a determinação do teor total de BZN, 200  $\mu$ L da formulação foram adicionados a um balão volumétrico de 5 mL e solubilizados em 4 mL de THF, para desfazer as nanoestruturas e liberar o BZN para ser quantificado. Em seguida, o volume foi completado com metanol,

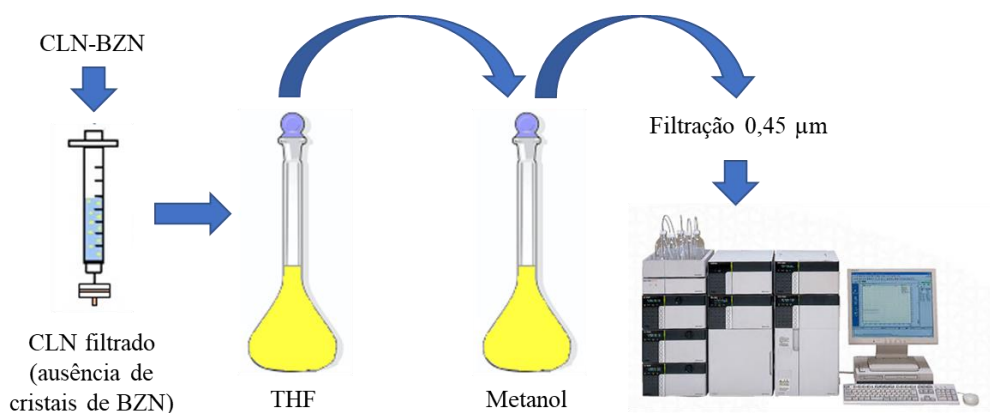
filtrado em membranas polietrafluoretileno (PTFE) de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore; Billerica, EUA) para análise no cromatógrafo (Figura 11).

**Figura 11 - Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração total de BZN.**



Para a análise do BZN encapsulado (após a filtração), a dispersão de CLN contendo BZN foi previamente filtrada em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore; Billerica, EUA) para remoção do fármaco não encapsulado. Em seguida, uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  do filtrado foi transferido para balão volumétrico de 5 mL, solubilizado em 4 mL de THF e o volume foi completado com metanol. Então, o mesmo procedimento descrito para determinação do BZN total foi adotado (Figura 12).

**Figura 12 - Representação esquemática da metodologia para a determinação da concentração de BZN filtrado.**



A concentração de BZN na fase aquosa externa do sistema foi determinada após ultrafiltração em membrana com limite para massa molecular de 100 kDa (Amicon® 100 k,

Millipore, Billerica, EUA). Uma alíquota de 500 µL da formulação foi transferida para microtubo contendo a membrana de ultrafiltração e centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 25°C. O ultrafiltrado foi transferido para vial e analisado por HPLC. A concentração de BZN na fase aquosa externa foi insignificante e, deste modo, o teor de encapsulação (TE) foi calculado utilizando a equação:

$$\text{TE (\%)} = \frac{\text{BZN do filtrado}}{\text{BZN total}} \times 100$$

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  DP e as determinações foram realizadas em triplicata.

#### ***4.3.4 Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier***

Foram obtidos espectros de absorção na região do infravermelho dos componentes da formulação em seus estados físicos à temperatura ambiente (BZN, Compritol® 888 ATO, TCM, Tween® 80, Poloxamer 407 e glicerol), do CLN sem fármaco (CLN-BR), CLN contendo BZN (CLN-BZN) e da mistura física entre o BZN e CLN-BR em uma proporção 1:5. As formulações (CLN-BR e CLN-BZN) foram previamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 24h a -50 °C no liofilizador Labconco (Kansas, EUA). Os componentes da formulação foram analisados em seu estado físico em temperatura ambiente.

Para a análise, utilizou-se o espectrofotômetro FTIR (do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) modelo 640-IR (Varian; Califórnia, EUA), equipado com modo de reflectância total atenuada (ATR, Pike Technologies, modelo GladiATR), na região de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>, com resolução 4 cm<sup>-1</sup> e 32 acumulações, disponível no Departamento de Química da UFVJM.

#### ***4.3.5 Difração de raios X***

A difração de raios X (DRX) foi realizada utilizando o difratômetro RXD-6000 (Shimadzu; Kyoto, Japão) disponível no Departamento de Química da UFVJM. As amostras de CLN-BR e CLN-BZN, previamente congeladas em nitrogênio líquido, foram liofilizadas por 24 h a -50 °C (Liofilizador Labconco; Kansas, EUA). Os componentes sólidos puros



(Compritol® 888 ATO, Poloxamer 407 e BZN) foram submetidos à análise direta. Realizou-se também a análise da mistura física entre o BZN e o CLN-BR em uma proporção 1:5. Empregou-se a radiação Cu K $\alpha$ , ( $\lambda = 1,540560 \text{ \AA}$ ) e  $2\theta$  variando de 10 a 50°, com velocidade de varredura de  $0,06^\circ 2\theta \cdot s^{-1}$ .

#### **4.3.6 Análises térmicas**

Curvas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e por termogravimetria (TG) foram obtidas para os constituintes sólidos da formulação (BZN, Compritol® 888 ATO e Poloxamer 407), CLN-BR e CLN-BZN. As formulações (CLN-BR e CLN-BZN) foram previamente congeladas por nitrogênio líquido e liofilizadas por 24h a -50 °C no liofilizador Labconco (Kansas, EUA).

As curvas DSC foram obtidas na célula DSC60 Shimadzu® (Tóquio, Japão) sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min, razão de aquecimento de 10 °C/min, com aquecimento de 30 a 400 °C, cadinho de alumínio fechado e massa de amostra exatamente cerca de 1,5 mg.

As curvas termogravimétricas foram obtidas na termobalança DTG60 Shimadzu® (Tóquio, Japão) com razão de aquecimento de 10 °C/min, aquecimento de 30 a 600 °C, atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min, cadinho de alumínio e massa de amostra exatamente cerca de 2,5 mg.

#### **4.3.7 Microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia dos CLN foi avaliada a partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se um microscópio de varredura modelo VEJA-LMH - TESCAN (Kohoutovice – República Tcheca). As amostras foram diluídas na fase externa da formulação (1:10), depositadas sobre lamínulas de vidro dispostas sobre fitas de carbono e secas em dessecador por no mínimo 24 horas em temperatura ambiente. A metalização foi realizada em ouro/paládio através da técnica da pulverização no metalizador Quorum Q150R. As imagens obtidas foram processadas e analisadas através do software próprio do equipamento.

#### 4.4 Avaliação da estabilidade preliminar

A fim de avaliar a permanência do BZN no interior dos nanocarreadores, três lotes de formulação foram preparados, armazenados em frascos de penicilina protegidos da luz e conservados em temperatura de 4 °C por 60 dias. Em intervalos de 0, 7, 14, 28 e 60 dias, uma alíquota foi retirada e os seguintes parâmetros foram avaliados: diâmetro médio, IP, potencial zeta, pH e teor de encapsulação, conforme procedimento descrito nos itens anteriores. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP.

#### 4.5 Avaliação da atividade hemolítica

O ensaio de atividade hemolítica, adaptado de Scalise e colaboradores (2016) foi realizado adicionando 100  $\mu$ L da suspensão de hemácias a 4% em placa de 96 poços. Em seguida, 100  $\mu$ L dos seguintes tratamentos, em triplicata, foram adicionados aos poços: solução de BZN; CLN-BR e CLN-BZN nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100  $\mu$ g/mL. Como controle negativo 100  $\mu$ L de soro fisiológico (0,9% p/v) foram adicionados à suspensão de hemácias e como controle positivo 100  $\mu$ L de solução de saponina (1% p/v) foram adicionados. A placa foi mantida em agitação por 1h a 400 rpm em temperatura de 37°C. Após o tempo de incubação, a placa foi centrifugada à 3000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi retirado e transferido para outra placa de 96 poços. A quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada por meio da equação abaixo.

$$\% \text{ Hemólise} = \left[ \frac{\text{Abs} - \text{Abs}_{\text{controle negativo}}}{\text{Abs}_{\text{controle positivo}} - \text{Abs}_{\text{controle negativo}}} \right] \times 100$$

Abs = Absorbância da amostra

Abs<sub>controle negativo</sub> = Absorbância do controle negativo

Abs<sub>controle positivo</sub> = Absorbância do controle positivo

## 4.6 Estudos de atividade *in vitro*

### 4.6.1 Linhagem celular

Os estudos de atividade *in vitro* foram conduzidos utilizando a linhagem de células normais L929 (fibroblastos de camundongo), que foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB, 1,6% de L-glutamina 200 mM e 1% de solução estabilizada de antibióticos (estreptomicina 10 mg/mL e penicilina 10.000 UI/mL). A cultura de células foi mantida em garrafas T-75 em estufa umidificada em ambiente de 5% de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) em 37 °C.

O teste de atividade tripanocida foi realizado utilizando a forma epimastigota da cepa colombiana do *T. cruzi*. A cepa foi cultivada em meio LIT suplementado com 10% de SFB, 0,2% de solução de estreptomicina a 100 µg/mL e 0,18% de solução de hemina 10 mg/mL. A cultura foi mantida em garrafas T-75, em estufa incubadora para demanda bioquímica de oxigênio (BOD) em 26 °C e submetida a crescimento exponencial até que a fase estacionária fosse alcançada para realização dos experimentos.

### 4.6.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi medida pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) no qual o sal tetrazólio é reduzido a cristais de formazan na mitocôndria de células viáveis. As células L929 ( $1,0 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e pré-incubadas por 24h em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a fim de permitir a adaptação antes da adição dos tratamentos.

Solução de BZN livre e formulação recém-preparada (CLN-BZN) foram testadas em 8 concentrações: 1,95, 3,90, 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125 e 250 µg/mL. Após 72h de incubação estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 20 µL de MTT a 3 mg/mL foram adicionados a cada poço. As placas foram novamente incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 4h e, em seguida, o meio foi removido e substituído por 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan.

A viabilidade celular foi estimada pela medida da taxa de redução mitocondrial, determinada pela medida da absorbância dos cristais obtidos no comprimento de onda de 540 nm. Os valores de absorbância obtidos dos poços nos quais as células foram mantidas apenas no meio, sem tratamento, foram considerados como 100% de viabilidade celular. Solução de

cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) 0,02 M foi utilizada como controle positivo e foi efetiva em promover a inibição do crescimento celular. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células. Todos os tratamentos foram testados em triplicata em três experimentos independentes.

#### **4.6.3 Atividade tripanocida**

A avaliação da atividade tripanocida foi medida pelo método de contagem direta em câmara de Neubauer e realizada empregando as formas epimastigotas do *T. cruzi* coletados no início da fase estacionária da curva de crescimento. Os parasitas ( $2,0 \times 10^6$  parasita/poço) foram semeados em placas de 96 poços e, em seguida, adicionou-se os tratamentos. Solução de BZN livre e formulações recém-preparadas (CLN-BR e CLN-BZN) foram testadas em 8 concentrações: 1,95, 3,90, 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125 e 250  $\mu\text{g/mL}$ . Como controle negativo utilizou-se parasitas em LIT.

As placas foram incubadas por 72h em estufa BOD a 26 °C. Decorrido este tempo, o sobrenadante de cada poço foi coletado e os parasitas viáveis foram contados em câmara de Neubauer. O número de parasitas dos poços sem tratamento foi considerado como 100% de viabilidade celular. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de parasita. Todos os tratamentos foram testados em triplicata em três experimentos independentes.

#### **4.7 Análises estatísticas**

As médias e os DP foram calculados para todos os experimentos descritos anteriormente. Os dados de caracterização físico-química, do estudo de estabilidade e do teste de atividade hemolítica foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) *one-way*, com pós-teste de Tukey. Os dados de viabilidade celular foram verificados por meio de ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Para todas as análises foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0 e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor que 0,05.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Influência da composição sobre as características físico-químicas dos CLN-BZN

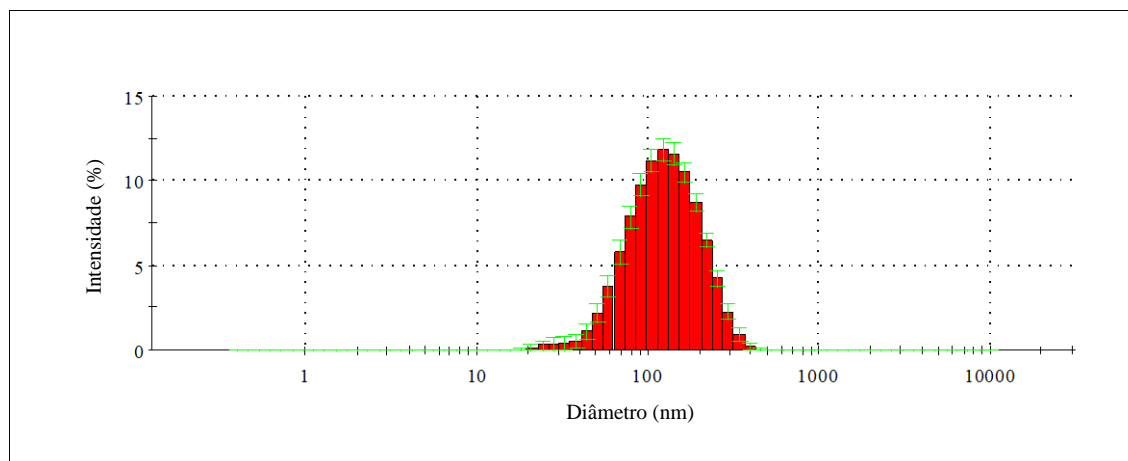
A formulação inicialmente proposta (CLN A) continha Compritol® 888 ATO e TCM como matriz lipídica e o sistema tensoativo foi composto apenas por Tween® 80. A substituição do TCM por óleo de soja (CLN B) não alterou o diâmetro médio das partículas (Tabela 5). A alteração do diâmetro médio foi significativa apenas para a combinação dos tensoativos Tween® 80 e lecitina de ovo (CLN E) e quando o poloxamer 407 (CLN G) foi avaliado como único tensoativo, aumentando de  $114 \pm 2$  nm (CLN A) para  $190 \pm 2$  nm (CLN E) e  $131 \pm 2$  nm (CLN G). O PZ apresentado por todas as formulações foi negativo, com valores entre -15,9 a -46,0 mV, que pode estar associado à presença de ácidos graxos livres ionizados na interface da partícula, naturalmente presentes no TCM, no óleo de soja, nas lecitinas e no Compritol® 888 ATO (Bruxel *et al.*, 2012).

**Tabela 5 - Caracterização dos CLN-BZN quanto a diâmetro, IP, PZ e TE.**

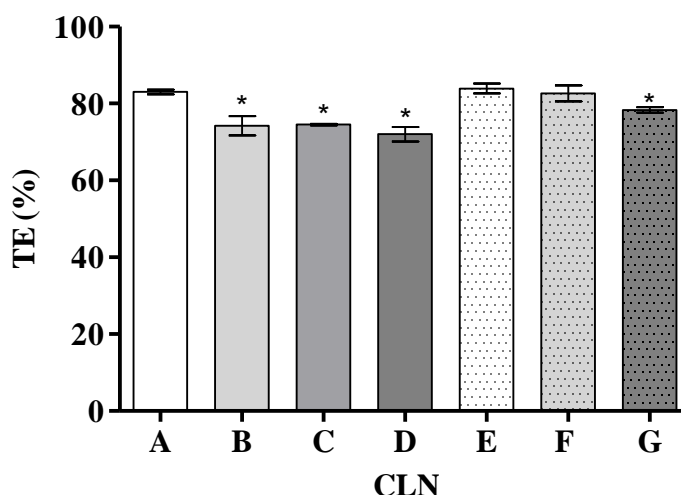
Formulação	Diâmetro (nm)	IP	PZ (mV)
CLN A	$114 \pm 2$	$0,25 \pm 0,02$	$-15,9 \pm 1,3$
CLN B	$115 \pm 1$	$0,26 \pm 0,01$	$-26,4 \pm 1,2^*$
CLN C	$114 \pm 2$	$0,26 \pm 0,01$	$-18,9 \pm 1,0$
CLN D	$119 \pm 2$	$0,29 \pm 0,03$	$-46,0 \pm 1,3^*$
CLN E	$190 \pm 2^*$	$0,42 \pm 0,01^*$	$-30,2 \pm 1,1^*$
CLN F	$110 \pm 3$	$0,19 \pm 0,01^*$	$-18,0 \pm 2,6$
CLN G	$131 \pm 2^*$	$0,26 \pm 0,04$	$-28,1 \pm 1,0^*$

Dados expressos como média  $\pm$  DP (n=3). \* Representa diferença significativa em relação ao CLN A ( $p < 0,05$ ).

Com exceção do CLN E, todas as demais formulações podem ser consideradas monodispersas, ou seja, apresentam IP menor que 0,3 (Danaei *et al.*, 2018). A combinação entre Tween® 80 e poloxamer 407 reduziu o IP de  $0,25 \pm 0,02$  (CLN A) para  $0,19 \pm 0,01$  (CLN F). A análise de distribuição de tamanho do CLN F (Figura 13), mostrou que 100 % das partículas apresentam diâmetro médio inferior a 500 nm e 85,9 % das partículas apresentam diâmetro médio inferior a 200 nm.

**Figura 13 - Histograma de distribuição de tamanho do CLN F.**

A substituição do TCM (CLN A) por óleo de soja (CLN B) reduziu o TE de  $83,0 \pm 0,6$  para  $74,2 \pm 2,5$  %. Diante dessa redução, para as demais formulações, manteve-se o TCM como lípide líquido (Figura 14). Nenhuma das alterações propostas no sistema tensoativo promoveu o aumento do TE quando comparado à formulação inicial. Assim, considerando os parâmetros analisados até o momento, foi escolhido o CLN F para seguimento dos estudos, uma vez que foi a formulação mais homogênea e com maior TE.

**Figura 14 - Influência do lípide líquido e do sistema tensoativo no TE.**

Dados expressos como média  $\pm$  DP (n=3). \* Representa diferença significativa em relação ao CLN A ( $p < 0,05$ ).

Com o aumento na concentração de lípides (CLN H a CLN K), ocorreu aumento no diâmetro médio de todas as formulações, além de aumento na heterogeneidade dos nanossistemas, com exceção do CLN H (Tabela 6). Apesar deste aumento, todas as formulações

podem ser consideradas sistemas monodispersos. O PZ permaneceu negativo em todas as formulações.

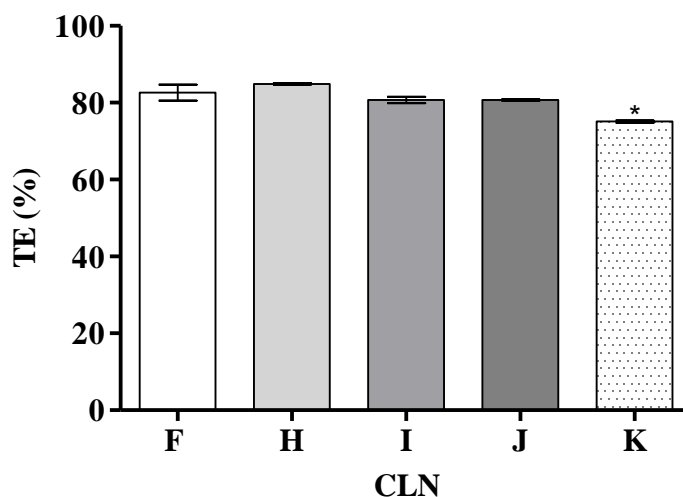
**Tabela 6 - Influência da concentração de lípides no diâmetro, IP e PZ dos CLN.**

Formulação	Diâmetro (nm)	IP	PZ (mV)
CLN F	110 ± 3	0,19 ± 0,01	-18,0 ± 2,6
CLN H	191 ± 2*	0,21 ± 0,00	-16,0 ± 0,3
CLN I	147 ± 6*	0,23 ± 0,02*	-6,0 ± 0,6*
CLN J	180 ± 3*	0,25 ± 0,01*	-32,0 ± 0,9*
CLN K	330 ± 1*	0,25 ± 0,02*	-30,4 ± 0,9*

Dados expressos como média ± DP (n=3). \* Representa diferença significativa em relação ao CLN F ( $p < 0,05$ ).

Nenhuma das alterações propostas na concentração de lípides aumentou o TE do BZN (Figura 15). A única alteração significativa no TE foi a redução de  $82,6 \pm 2,1$  (CLN F) para  $75,1 \pm 0,3$  no CLN K. Assim, o CLN-F, que apresenta menor conteúdo lipídico em sua composição, permaneceu como a formulação de escolha.

**Figura 15 - Influência da concentração de lípides no TE.**



Dados expressos como média ± DP (n=3). \* Representa diferença significativa em relação ao CLN F ( $p < 0,05$ ).

Por fim, a última etapa proposta no desenvolvimento da formulação foi o aumento da concentração de BZN de 0,05% (CLN F) para 0,1% (CLN L) e 0,2% (CLN M). Os resultados de diâmetro médio, IP e PZ estão apresentados na tabela 7. O aumento na concentração de BZN

não influenciou o diâmetro médio e o PZ das partículas e todos os sistemas foram considerados monodispersos.

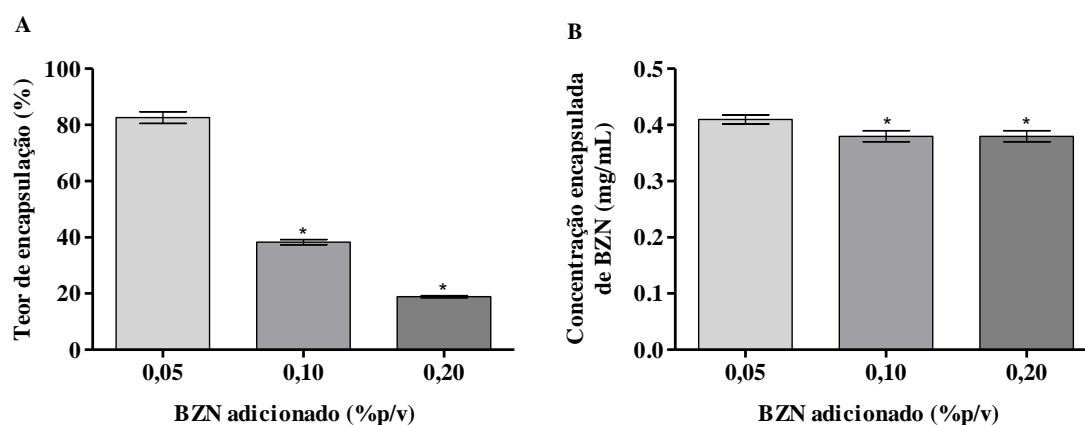
**Tabela 7 - Influência da concentração de BZN nas características dos CLN.**

Formulação	Diâmetro (nm)	IP	PZ (mV)
CLN F	110 ± 3	0,19 ± 0,01	-18,0 ± 2,6
CLN L	113 ± 4	0,24 ± 0,001*	-23,5 ± 3,5
CLN M	116 ± 6	0,24 ± 0,02*	-22,8 ± 1,8

Dados expressos como média ± DP (n=3). \* Representa diferença significativa em relação ao CLN F (p < 0,05).

Com relação à concentração de BZN encapsulada (Figura 16), observou-se uma redução significativa no TE com o aumento da concentração de BZN. No entanto, a concentração efetivamente encapsulada permaneceu praticamente a mesma para o CLN L e CLN M, sendo  $0,38 \pm 0,01$  mg/mL para estas duas formulações e  $0,41 \pm 0,01$  mg/mL para o CLN F. Como o lípide possui certa capacidade de carreamento do fármaco, estes dados sugerem que o sistema possa estar saturado, não permitindo, assim, a incorporação de quantidades maiores que 0,05% de BZN. Desta forma, permaneceu-se com o CLN F como a formulação de escolha e, portanto, as demais caracterizações e análises biológicas *in vitro* foram realizadas com esta formulação.

**Figura 16 - Influência da concentração de BZN no TE (A) e na concentração de BZN incorporado nos CLN (B).**



Dados expressos como média ± DP (n=3). \* Representa diferença significativa em relação à adição de 0,05% de BZN (p < 0,05).



## 5.2 Espectroscopia na região do infravermelho

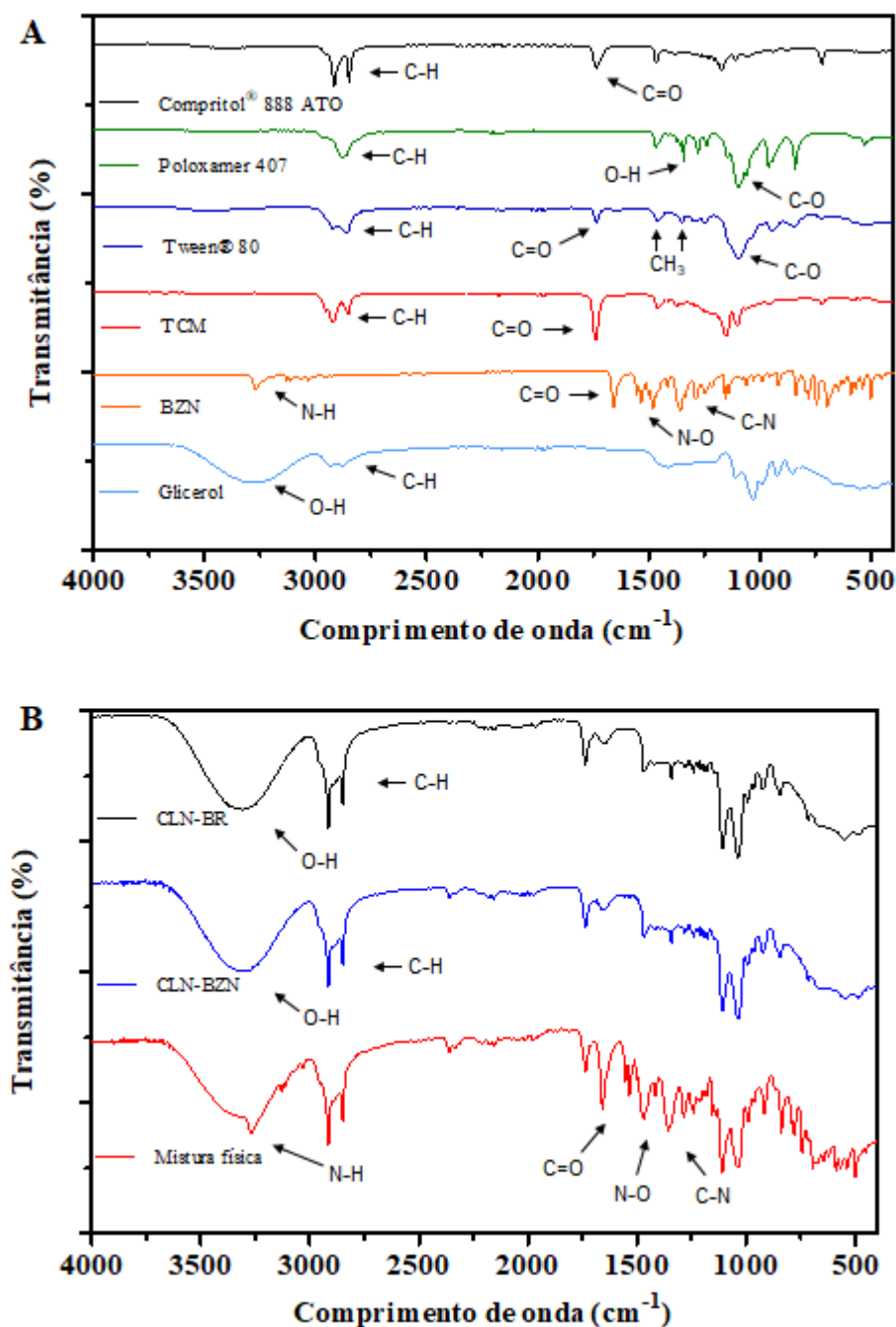
Espectros de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para todos os componentes da formulação são mostrados na Figura 17A. O espectro de FTIR do Compritol® 888 ATO mostrou bandas de absorção de alongamento C-H em 2815 e 2849  $\text{cm}^{-1}$ , alongamento C=O em 1740  $\text{cm}^{-1}$ , além de numerosas bandas vibracionais na área entre 700 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ , que são relacionadas aos grupos metileno (Rahman; Zidan; Khan, 2010; Aburahma; Badr-Eldin, 2014). O espectro de FTIR do poloxamer 407 é caracterizado pelo pico de absorção em 2893  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-H de cadeias carbônicas alifáticas, pelo pico de absorção em 1355  $\text{cm}^{-1}$  referente a ligação O-H no plano e pelo pico de absorção em 1125  $\text{cm}^{-1}$  referente à ligação C-O (Garala *et al.*, 2013).

O Tween® 80 mostrou bandas de absorção em 2930 e 2860  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento C-H, em 1735  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento C=O de grupamentos ésteres, em 1458 e 1351  $\text{cm}^{-1}$  referente às vibrações simétricas e assimétricas de  $\text{CH}_3$ , além de alongamento C-O de ésteres em 1100  $\text{cm}^{-1}$  (Li *et al.*, 2012). O espectro de absorção do TCM apresentou alongamento C-H em 2956, 2923 e 2854  $\text{cm}^{-1}$ , bem como uma banda de absorção em 1744  $\text{cm}^{-1}$  referente ao alongamento C=O de ácidos carboxílicos (Kiefer *et al.*, 2016).

O BZN, por sua vez, apresentou banda de absorção em 3330  $\text{cm}^{-1}$  referente à vibrações de alongamento da ligação N-H de amina secundária, além de bandas de absorção em 1685  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao alongamento de ligação C=O do grupamento amida, alongamento de ligação N-O do grupo  $\text{NO}_2$  na faixa de 1660-1500  $\text{cm}^{-1}$ , alongamento de ligação C-C de anel aromático em 1500-1420  $\text{cm}^{-1}$ , alongamento de ligação C-N em 1318  $\text{cm}^{-1}$  e bandas de absorção na faixa de 1250-1000  $\text{cm}^{-1}$  devido à deformação axial de ligação C-H de grupos aromáticos (Soares-Sobrinho *et al.*, 2010; De Melo *et al.*, 2017). O glicerol mostrou uma banda forte e larga em 3400-3200  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao grupamento hidroxila, e alongamento C-H de cadeias carbônicas alifáticas em 2960-2850  $\text{cm}^{-1}$  (Glavcheva-Laleva *et al.*, 2015).

No espectro de absorção do CLN-BR (Figura 17B), pode-se perceber a banda forte e larga referente ao grupamento hidroxila do glicerol na região de 3400-3200  $\text{cm}^{-1}$  e os estiramentos de C-H na região de 2900-2700  $\text{cm}^{-1}$  referentes ao Compritol® 888 ATO, poloxamer 407, Tween® 80 e TCM. O espectro de absorção do CLN-BZN apresenta perfil de absorção no infravermelho similar ao observado para o CLN-BR. Além disso, não se notam os picos característicos do BZN e destaca-se principalmente a ausência da banda de absorção em 3330  $\text{cm}^{-1}$ , referente à deformação axial de ligação N-H de amina secundária.

**Figura 17 - Espectro de absorção no infravermelho das substâncias puras (A) e CLN-BR, CLN-BZN e mistura física (B).**



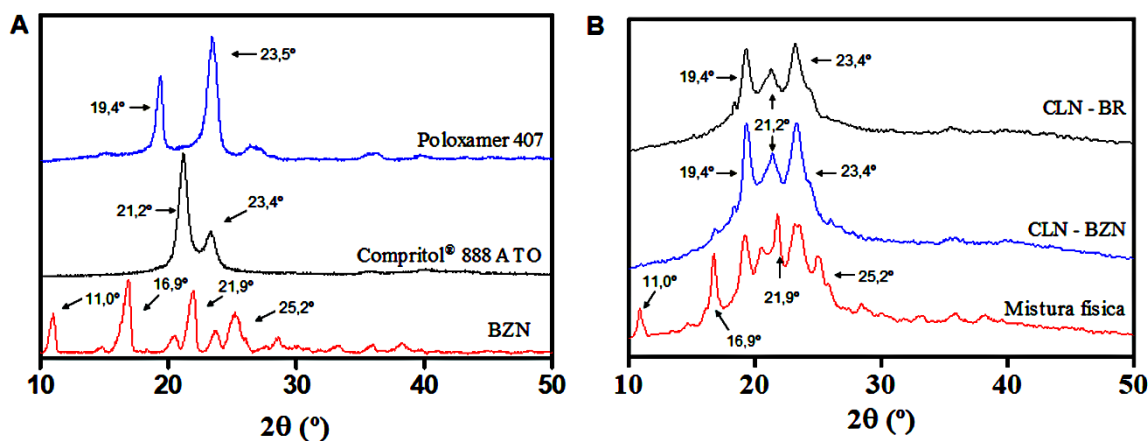
O perfil do espectro de absorção da mistura física simula o que seria encontrado caso a maior parte do BZN não estivesse no interior do nanocarreador. Neste espectro é possível observar a banda de absorção referente a ligação N-H da amina secundária ( $3330 \text{ cm}^{-1}$ ) e as bandas de absorção em  $1250\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$  referentes à deformação axial de ligação C-H de grupos

aromáticos, presentes também no espectro do BZN. As bandas referentes ao grupamento amida ( $1685\text{ cm}^{-1}$ ) e ao grupo  $\text{NO}_2$  ( $1660\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ) do BZN também podem ser observadas.

### 5.3 Difração de raios-X

Os difratogramas das matérias-primas que compõem a formulação em estudo são apresentados na Figura 18A. O Compritol® 888 ATO apresentou dois picos de difração, um pico de alta intensidade em  $21,2^\circ$  e um pico de menor intensidade em  $23,4^\circ$ , espaçamentos curtos característicos da forma  $\beta'$  (Hamdani; Moës; Amighi, 2003; Fini *et al.*, 2011). O difratograma do poloxamer 407 mostrou dois picos característicos com alta intensidade e ângulos de difração em  $2\theta$  de  $19,4^\circ$  e  $23,5^\circ$  (García-Millán; Quintáns-Carballo; Otero-Espinar, 2017). O BZN apresentou um padrão típico de difração policristalina, exibindo picos agudos principais em  $11,0^\circ$ ,  $16,9^\circ$ ,  $21,9^\circ$  e  $25,2^\circ$ , um padrão similar ao encontrado por outros trabalhos (Palmeiro-Roldán *et al.*, 2014; De Melo *et al.*, 2017).

**Figura 18 - Difratogramas das matérias-primas sólidas (A) e dos CLN com e sem BZN e da mistura física (B).**



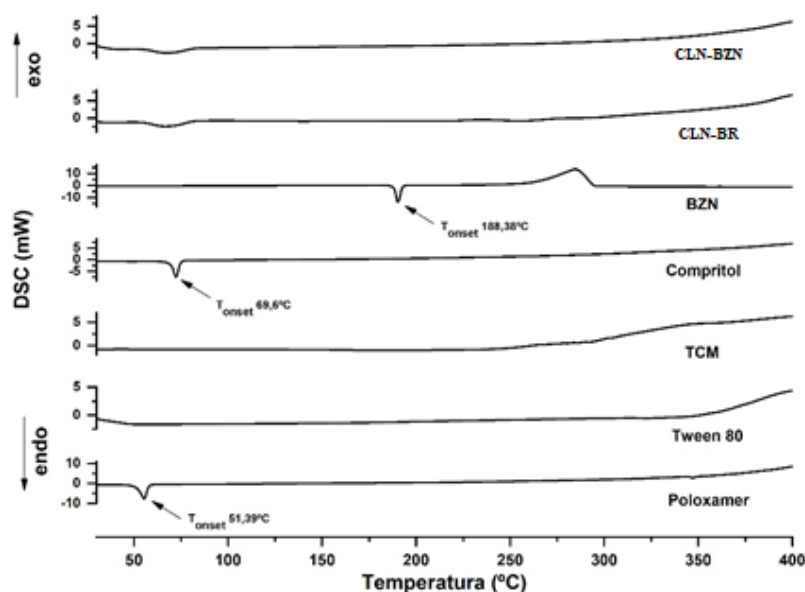
O CLN-BR apresentou três picos de difração, dois com maior intensidade em  $19,3^\circ$  e  $23,4^\circ$  e um pico com menor intensidade em  $21,2^\circ$  (Figura 18B). Estes picos são referentes ao Compritol® 888 ATO e ao Poloxamer 407. O difratograma do CLN-BZN também mostrou três picos de difração ( $19,3^\circ$ ,  $21,2^\circ$  e  $23,4^\circ$ ), padrão idêntico ao CLN-BR. Além disso, quando se analisam os dados de DRX do CLN-BZN, não se encontram picos de difração característicos do BZN. Este dado corrobora com o alto TE do fármaco ( $82,6 \pm 2,1\%$ ) e mostra que de fato a maior parte do BZN encontra-se encapsulado.

O difratograma da mistura física mostrou picos correspondentes ao fármaco e à matriz lipídica, sendo os principais em 19,3°, 21,2° e 23,4° referentes ao Poloxamer 407 e ao Compritol® 888 ATO. Foram também observados picos em 11,0°, 16,8°, 21,9° e 25,2° referentes ao BZN, o que reforça que houve encapsulação do ativo de fato no CLN-BZN.

#### 5.4 Calorimetria exploratória diferencial

As curvas de DSC para as formulações e seus constituintes estão apresentadas na Figura 19. A curva de DSC para o BZN mostrou um evento endotérmico próximo a 188 °C, que é referente à fusão do fármaco. Este dado é coerente com a faixa de fusão do BZN, que é de 188 °C a 190 °C (Brasil, 2010). A partir de 220 °C, nota-se o início de um evento exotérmico, característico da decomposição do fármaco. Os eventos endotérmicos apresentados pelo Compritol® 888 ATO (69,60 °C) e pelo poloxamer 407 (51,39 °C) são coerentes com o ponto de fusão dessas substâncias (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009; Fini *et al.*, 2011). Não foram observados eventos térmicos nas curvas do TCM e do Tween® 80, ambos materiais são líquidos à temperatura ambiente e, portanto, não há evento térmico referente à fusão e não foi observado nenhum evento que pudesse ser associado à degradação desses materiais, sendo assim estáveis até 400 °C. O CLN-BNZ e CLN-BR apresentaram comportamento térmico semelhante, com um único evento endotérmico próximo a 62 °C.

**Figura 19 - Curvas de DSC dos componentes, CLN-BZN e CLN-BR sob atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de 10 °C/min.**



O comportamento térmico das formulações e seus constituintes estão resumidos na tabela 8. Observa-se também que os calores envolvidos no evento endotérmico referente à fusão do CLN-BZN e do CLN-BR são semelhantes, assim como o que foi observado com a temperatura ( $T_{\text{onset}}$ , °C).

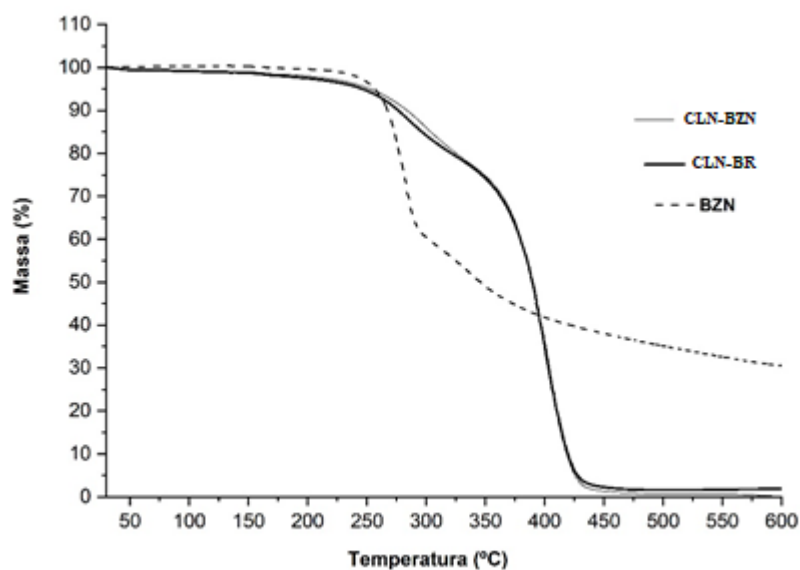
**Tabela 8 - Fenômeno, temperatura ( $T_{\text{onset}}$ , °C) e calor ( $\Delta H$ , J/g) encontrados nas curvas DSC dos CLN e seus insumos farmacêuticos.**

<b>Amostra</b>	<b>Fenômeno</b>	<b><math>T_{\text{onset}}</math> (°C)</b>	<b><math>\Delta H</math> (J/g)</b>
<b>CLN-BZN</b>	Fusão	64,07	85,79
<b>CLN-BR</b>	Fusão	63,74	87,40
<b>BZN</b>	Fusão	188,38	133,01
<b>Compritol® 888 ATO</b>	Fusão	69,60	117,76
<b>TCM</b>	-	-	-
<b>Tween® 80</b>	-	-	-
<b>Poloxamer 407</b>	Fusão	51,39	117,48

### 5.5 Termogravimetria

A decomposição térmica do BZN tem início em 223 °C e o processo ocorre em duas etapas, totalizando 60% de perda de massa. O CLN-BR apresenta o início da decomposição térmica em 218 °C, com perda de massa total de 93% e o evento acontece em três rampas. A curva de TG do CLN-BZN apresenta comportamento termogravimétrico similar ao CLN-BR, com início de decomposição em 211 °C e perda de massa em três etapas com um total de 95% (Figura 20). Assim, as temperaturas do início de perda de massa indicam que as formulações apresentam estabilidade térmica até 210 °C.

**Figura 20 - Curvas de TG do BZN, CLN-BR e CLN-BZN, sob atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de 10 °C/min.**

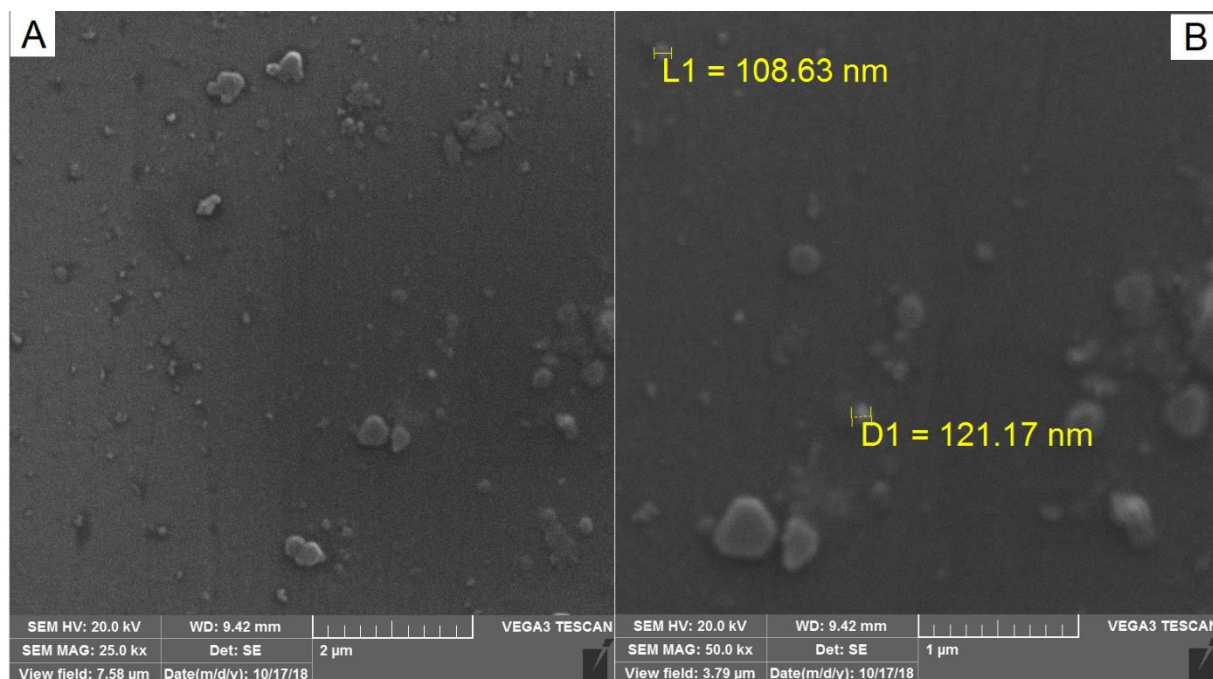


## 5.6 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens obtidas por MEV mostram que os CLN apresentam morfologia esférica (Figura 21A). Na figura 21B é possível observar partículas com diâmetro na faixa de 110-120 nm, valores semelhantes aos obtidos por DLS ( $110 \pm 3$  nm). Além disso, as partículas observadas na imagem apresentam diâmetro inferior a 500 nm, coerente com a distribuição de tamanho obtida também por DLS.

Foi também observada a presença de alguns aglomerados de partículas, mas que podem estar associados ao processo de secagem necessário para a preparação da amostra e realizado antes da análise por microscopia, devido à natureza lipídica dos carreadores (Patel *et al.*, 2012).

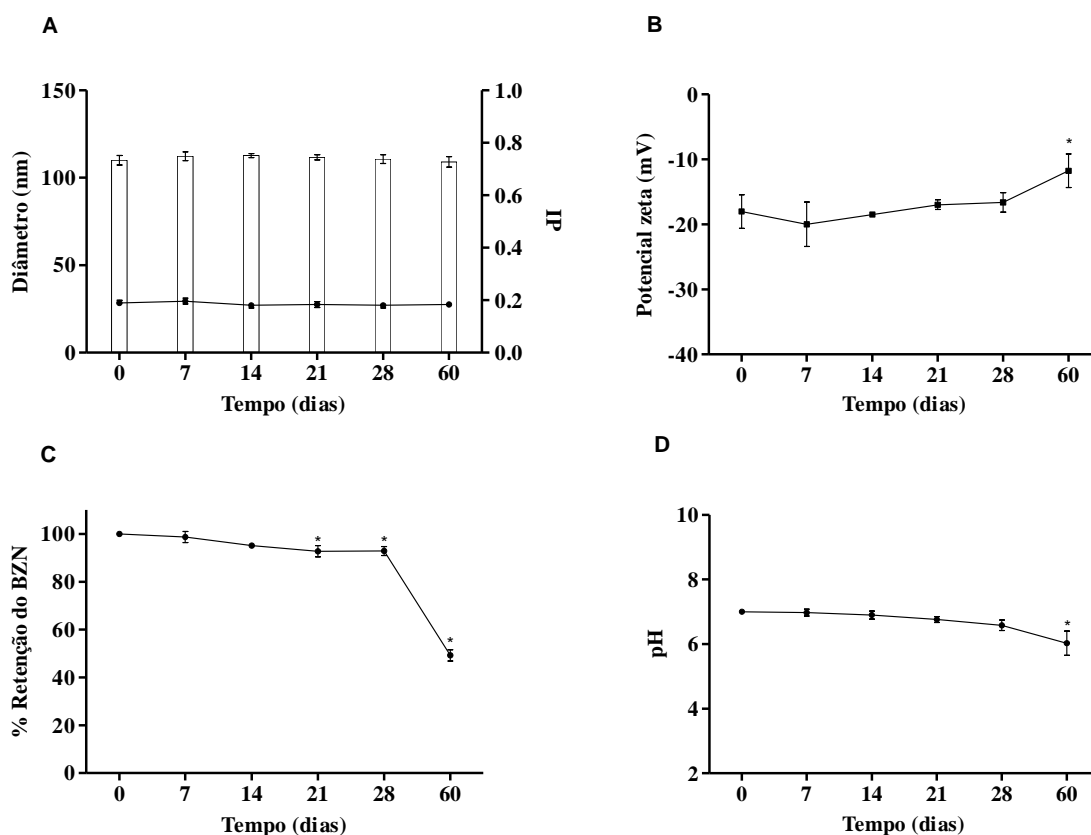
**Figura 21 - Micrografias do CLN-BZN em aumento de 25.000x (A) e 50.000x (B).**



### 5.7 Avaliação da estabilidade preliminar

Após 60 dias de armazenamento em temperatura de 4 °C, o CLN F não apresentou alteração significativa no diâmetro médio e no IP (Figura 22A). O PZ manteve-se negativo durante todo o estudo, apresentando variação estatisticamente significativa apenas no tempo de 60 dias (Figura 22B). Não houve alteração na concentração retida de BZN até 14 dias e uma redução pequena e gradativa foi observada até 28 dias. Decorrido 28 dias, a concentração de BZN apresentada foi de  $93,8 \pm 0,4\%$ , ou seja, uma redução de apenas 6,2% em comparação ao início do estudo (Figura 22C). Entretanto, após 60 dias de armazenamento, ocorreu uma diminuição drástica na retenção do fármaco, sendo esta de  $49,2 \pm 2,4 \%$ , praticamente a metade do teor inicial de BZN. O pH permaneceu estável até 28 dias e redução de uma unidade de pH foi observada ao final de 60 dias ( $6,03 \pm 0,37$ ). Diante destes resultados, pode-se dizer que a formulação é praticamente estável por até 28 dias de armazenamento nas condições do estudo.

**Figura 22 - Estabilidade do CLN F ao longo de 60 dias, em relação diâmetro médio e IP (A), PZ (B), retenção de BZN (C) e pH (D).**



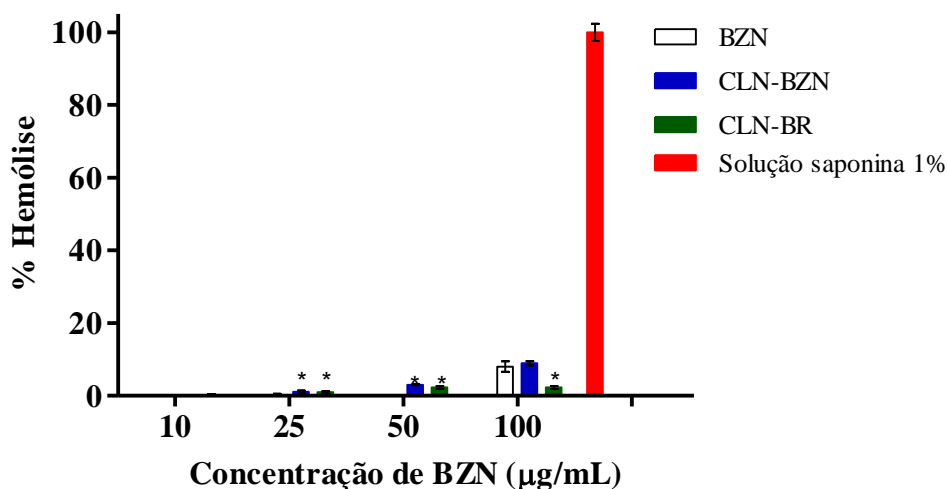
Dados expressos como média  $\pm$  DP (n=3). \* Representa diferença significativa em relação ao tempo 0 ( $p < 0,05$ ).

## 5.8 Avaliação da atividade hemolítica

Os resultados encontrados no teste de atividade hemolítica estão apresentados na figura 23. Na menor concentração avaliada (10  $\mu\text{g/mL}$ ) nenhum dos tratamentos causou danos às hemácias. Nas concentrações intermediárias (25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) os nanocarreadores, CLN-BR e CLN-BZN, foram responsáveis por um percentual de hemólise inferior a 3%, enquanto o BZN em solução não provocou o rompimento das células. Na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , os percentuais de hemólise foram  $8,0 \pm 1,4$  para o BZN em solução,  $8,9 \pm 0,6$  para o CLN-BZN e  $2,3 \pm 0,4$  para o CLN-BR. Esses resultados mostram que, na maior concentração avaliada, tanto o fármaco livre quanto o encapsulado causaram danos similares às hemácias e superior ao CLN-BR.



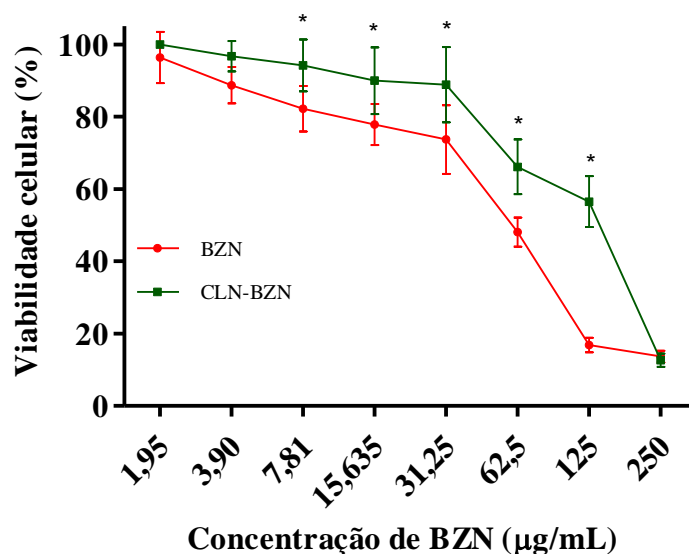
**Figura 23 - Atividade hemolítica do BZN, CLN-BZN e CLN-BR.**



Dados expressos como média  $\pm$  DP (n=3). \* Representa diferença significativa em relação ao BZN ( $p < 0,05$ ). Os CLN-BR foram diluídos da mesma forma que o CLN-BZN.

### 5.9 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular da linhagem L929 após o tratamento com BZN livre e CLN-BZN foi dependente da concentração testada (Figura 24). Observou-se redução da viabilidade celular para aproximadamente 15% quando se utilizou 250  $\mu\text{g/mL}$  em ambos os tratamentos, não havendo diferença entre eles. Em 125  $\mu\text{g/mL}$ , o BZN livre ainda permanece altamente citotóxico, enquanto que o CLN-BZN apresentou percentual de viabilidade celular significativamente maior, em torno de 55%, contra aproximadamente 17% do fármaco livre. Até a concentração de 8  $\mu\text{g/mL}$ , a formulação permanece sendo menos tóxica que o fármaco livre, sendo aproximadamente 94% para o CLN-BZN e 82% para o BZN livre. Assim, os dados indicam que a encapsulação do BZN nos CLN reduz a toxicidade do fármaco. Este fato pode ser evidenciado por meio dos valores de  $\text{CC}_{50}$ , o BZN apresentou  $\text{CC}_{50}$  de  $51,3 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$  enquanto que a  $\text{CC}_{50}$  do CLN-BZN foi de  $110,7 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ , ou seja, aproximadamente o dobro do valor apresentado pelo fármaco livre.

**Figura 24 - Viabilidade celular da linhagem L929 após 72h de tratamento.**

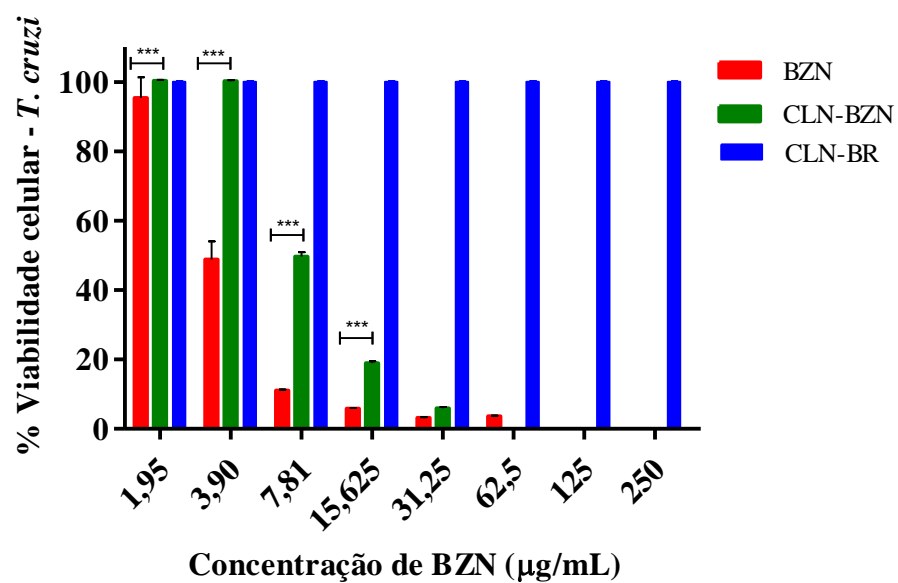
Dados expressos como média  $\pm$  DP (n=3). \* Representa diferença significativa em relação ao BZN ( $p < 0,05$ ).

### 5.10 Avaliação da atividade tripanocida

A viabilidade celular de formas epimastigotas da cepa colombiana de *T. cruzi* após o tratamento com BZN livre e CLN-BZN também foi dependente da concentração testada (Figura 25). Não há diferenças estatisticamente significativa entre o BZN livre e o CLN-BZN na faixa de concentração de 31 a 250  $\mu\text{g/mL}$ . Nas concentrações de 125  $\mu\text{g/mL}$  e 250  $\mu\text{g/mL}$  houve 100% de redução de viabilidade celular pra ambos os tratamentos. Em 31  $\mu\text{g/mL}$  a redução da viabilidade celular foi em torno de 5%, tanto para o BZN quanto para o CLN-BZN.

Em concentrações menores que 31  $\mu\text{g/mL}$  o BZN livre apresentou uma redução da viabilidade celular maior que o CLN-BZN. O CLN-BR apresentou 100% de viabilidade celular em todas as concentrações testadas. O BZN apresentou  $\text{IC}_{50}$  de  $3,9 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$  enquanto que a  $\text{IC}_{50}$  do CLN-BZN foi de  $8,4 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ .

**Figura 25 - Viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* após 72h de tratamento.**



Dados expressos como média  $\pm$  DP (n=3). \* Representa diferença significativa em relação ao BZN ( $p < 0,05$ ). Os CLN-BR foram diluídos da mesma forma que o CLN-BZN.



## 6 DISCUSSÃO

O benznidazol (BZN) é um fármaco pouco solúvel em água e desta forma sua farmacocinética se torna desfavorável, apresentando absorção oral irregular e limitações para administração oral (Maximiano *et al.*, 2011a). Para contornar este problema, dentre os nanossistemas baseados em lípides, os CLN têm sido propostos para promover aumento na absorção oral deste tipo de fármaco e também na sua biodisponibilidade, uma vez que apresentam elevada estabilidade nas condições fisiológicas encontradas no TGI e como produto farmacêutico durante seu período de armazenamento (Beloqui *et al.*, 2016; 2017). Outros nanossistemas lipídicos podem ser instáveis no TGI, como os lipossomas, por exemplo, ou apresentarem baixa estabilidade durante o armazenamento, como as nanoemulsões (Beloqui *et al.*, 2017).

Assim, neste trabalho foram propostos CLN contendo BZN voltados para administração oral, buscando parâmetros ótimos de tamanho das partículas e sua distribuição em frequência, PZ e TE do fármaco. O tamanho das nanopartículas é uma característica que afeta o perfil de liberação do fármaco, biodistribuição, captação celular e a estabilidade da formulação (Danaei *et al.*, 2018). Por outro lado, quanto o maior o valor de PZ (negativo ou positivo), maior a probabilidade de uma dispersão coloidal ser estável, pois as partículas carregadas se repelem e, desta forma, contornam a tendência natural de agregação com a repulsão elétrica (Heurtault *et al.*, 2003). Por fim, quanto maior o TE em termos de concentração nominal, maior a eficiência de carreamento do fármaco pela partícula.

A formulação otimizada (denominada CLN F) apresentou diâmetro médio de 110 nm, valor coerente com as imagens obtidas por MEV e considerado adequado para administração oral, uma vez que podem apresentar internalização em maior extensão do que nanopartículas maiores (Beloqui *et al.*, 2017). Neste sentido, Li *et al.* (Li *et al.*, 2016) observaram que em 2 horas a captação por células Caco-2 de nanopartículas de 100 nm foi 1,17 e 1,66 vezes maior que nanopartículas de 200 e 300 nm, respectivamente. Além disto, a biodisponibilidade da cumarina-6 em ratos após administração oral por gavagem foi aumentada em 1,22 e 1,80 vezes com CLN com tamanho de 100 nm quando comparado aos mesmos carreadores com 200 e 300 nm de tamanho, respectivamente. A formulação bem-sucedida de nanocarreadores estáveis requer também que a população de nanopartículas seja homogênea e monodispersa. Assim, IP abaixo de 0,3, conforme foi encontrado na formulação de escolha ( $0,19 \pm 0,01$ ) é um valor considerado como associado a uma distribuição de tamanho estreita e monodispersa (Danaei *et al.*, 2018).

O PZ apresentado pela formulação de escolha foi de -18,0 mV, que poderia não ser considerado um indicador de boa estabilização da nanodispersão, já que é buscado pelo menos um valor de 30 mV em módulo para que haja eficiência em se evitar a agregação das partículas (Das; Chaudhury, 2011). Entretanto, a formulação desenvolvida contém em sua composição tensoativos etoxilados como o poloxamer 407 e o Tween<sup>®</sup> 80, que promovem impedimento estérico, devido às cadeias hidrofílicas de óxido de polietileno que permanecem na fase aquosa e ao tamanho de suas moléculas (Wulff-Perez *et al.*, 2012; Yemparala *et al.*, 2014; Belouqui *et al.*, 2017). Com isso, em combinação com a estabilização estérica, podem-se obter dispersões coloidais estáveis com valores de PZ menores, como até 8-9 mV (Heurtault *et al.*, 2003). De fato, foi observada estabilidade das nanopartículas por até 60 dias sob refrigeração (4 °C), sem grandes alterações dos valores de diâmetro médio, IP e PZ nas condições avaliadas. Em muitos casos, o aumento do tamanho das nanopartículas precede outras alterações macroscópicas, sendo assim um bom indicador de instabilidade (Heurtault *et al.*, 2003; Bahari; Hamishehkar, 2016).

A encapsulação do BZN nos CLN propostos foi considerada elevada, apresentando um TE de 82,6 %, equivalente a 0,41 mg/mL de BZN. O aumento na concentração de lípidos e na quantidade inicial de BZN adicionado não resultou em aumento significativo da encapsulação, indicando uma possível saturação do nanocarreador. O aumento excessivo no teor lipídico pode levar a elevada toxicidade, e, por isto, não é recomendado, uma vez que a citotoxicidade tem sido relatada como dependente da natureza da matriz lipídica e da sua concentração e pode estar relacionado ao aumento de ácidos graxos livres oriundos da degradação enzimática da matriz lipídica (Schöler *et al.*, 2002; Ridolfi *et al.*, 2011). Assim, a relação fármaco/lípido (carga de fármaco ou *drug loading*) observada foi de 1,64%, maior que os sistemas lipídicos desenvolvidos anteriormente: 0,47% e 0,67%, respectivamente, para as NE e ME desenvolvidas por Streck *et al.* (2014; 2016) e 0,7% para os lipossomas de Morilla *et al.* (2004; 2005). A concentração de BZN encapsulado na formulação manteve-se constante por 14 dias e após 28 dias apenas uma redução de 6,2% foi observada. Como os dois grupos de estudo citados não avaliaram a estabilidade dos sistemas desenvolvidos, não é possível saber por quanto tempo a concentração de BZN foi mantida nos outros nanocarreadores.

O alto TE obtido também pode ser comprovado pelos dados de FTIR, DRX, DSC e TG devido ao comportamento semelhante entre o CLN-F e CLN-BR em cada uma das caracterizações, além da ausência de sinais atribuídos ao BZN nas caracterizações do CLN-F. Com relação as curvas de DSC, o formato alargado e com bordas parcialmente simétricas do sinal é típico de sistemas complexos, tais como os carreadores multicomponentes. Também é

observado uma diminuição na entalpia de fusão dos CLN em comparação ao lípide puro, caracterizando um menor grau de cristalinidade dos CLN (Li *et al.*, 2009; Gonullu *et al.*, 2015; Argimón *et al.*, 2017). Além disso, os dados de DSC e TG confirmam a obtenção de uma formulação com características físico-química próprias, uma vez que não existem eventos térmicos nas curvas do CLN-BZN que possam ser atribuídos pontualmente a alguma matérias-primas utilizadas, o que confirma também que quantitativamente as proporções utilizadas entraram na composição do sistema carreador (Bunjes; Unruh, 2007).

Um parâmetro importante a ser avaliado nos nanocarreadores lipídicos é a toxicidade e os eritrócitos representam um modelo indicativo direto de toxicidade de membranas, uma vez que sua lise libera hemoglobina e esta pode ser medida por métodos espectrofotométricos (De Freitas *et al.*, 2008; Noudeh; Khazaeli; Rahmani, 2008). O CLN-F apresentou baixa atividade hemolítica, que pode ser atribuída ao fármaco, uma vez que na maior concentração testada (100 µg/mL), tanto o BZN livre quando incorporado ao CLN apresentaram o mesmo percentual de hemólise, em torno de 9%. Resultado similar foi encontrado por Scalise *et al.* (2016) para o BZN na forma de nanocristais, que na concentração de 100 µg/mL causaram aproximadamente 6% de hemólise enquanto que o BZN na forma convencional, na concentração de 50 µg/mL, foi responsável por uma atividade hemolítica em torno de 9%. Os autores não testaram o BZN convencional na concentração de 100 µg/mL. O CLN-BR apresentou um percentual de hemólise inferior a 3%.

A toxicidade em células da linhagem L929 também foi avaliada e a encapsulação do BZN na formulação desenvolvida reduziu sua citotoxicidade. Na concentração de 125 µg/mL, o CLN-F apresentou viabilidade celular em torno de 55% após 72h de incubação comparado a 20% para o fármaco livre. A toxicidade do BZN em células de mamíferos é esperada devido a inespecificidade e alta reatividade dos metabólitos eletrofílicos oriundo do metabolismo do fármaco (Castro; De Mecca; Bartel, 2006). Estes resultados representam uma vantagem do CLN-F em relação à ME contendo BZN desenvolvida por Streck *et al.* (2016), que apresentou apenas cerca de 10% de viabilidade celular na concentração de 80 µg/mL de BZN após 12h de incubação em células da linhagem Vero. Os outros sistemas lipídicos nanoestruturados previamente desenvolvidos (Morilla *et al.*, 2002; 2004; Streck *et al.*, 2014) não realizaram estudos de toxicidade *in vitro*, não permitindo assim a comparação com o CLN-F.

Com relações aos valores de IC<sub>50</sub> para o BZN livre contra as formas epimastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi*, o resultado encontrado (3,9 µg/mL ou 14,6 µM) foi similar ao relatado por Moreno *et al.* (Moreno *et al.*, 2010) e Meira *et al.* (Meira *et al.*, 2015), respectivamente, 25,4 µM e 4,1 µg/mL. Destaca-se também que além da redução na toxicidade,

não houve diferença estatisticamente significativa na atividade tripanocida do BZN livre e encapsulado em concentrações iguais ou superiores à 31 µg/mL. Nesta concentração o CLN-F foi capaz de reduzir quase que completamente a viabilidade celular das formas epimastigotas do *T. cruzi* sem causar toxicidade significativa para as células L929. Além disso, como não foi observado toxicidade significativa a partir dos CLN-BR, pode-se atribuir o efeito apenas ao BZN, livre ou encapsulado. Não é possível saber se a atividade tripanocida *in vitro* do CLN-F é superior aos sistemas lipídicos nanoestruturados desenvolvidos anteriormente (Morilla *et al.*, 2002; 2004; Streck *et al.*, 2014; Streck *et al.*, 2016), uma vez que estes não foram avaliados quanto à este parâmetro.

O uso das formas epimastigotas é um modelo amplamente difundido como triagem inicial devido a sua facilidade de manutenção e custo (Fonseca-Berzal *et al.*, 2015a). Além disso, foi observada a existência de correlação entre a atividade tripanocida de alguns compostos contra epimastigotas e, do mesmo modo, contra amastigotas (Fonseca-Berzal *et al.*, 2014; Alvarez *et al.*, 2015), de forma que o ensaio com epimastigotas apresenta certo valor preditivo em relação às amastigotas. Assim, considerando a manutenção da atividade tripanocida e redução da toxicidade do CLN-F em comparação ao BZN livre, a formulação desenvolvida é promissora para os testes em formas amastigotas, encontradas na fase crônica da doença de Chagas.



## 7 CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo BZN e avaliação de sua eficácia tripanocida *in vitro*. A formulação escolhida, CLN-F, apresentou diâmetro médio compatível à administração oral, IP característico de uma formulação homogênea e monodispersa, PZ negativo e preditivo de uma formulação estável. As micrografias obtidas por MEV demonstraram que as partículas são esféricas e com diâmetro similar ao obtido por DLS.

O CLN-F apresentou alto TE de BZN e relação fármaco/lípide superior aos sistemas lipídicos desenvolvidos anteriormente. Os dados de FTIR, DRX e DSC forneceram indícios que corroboraram com a encapsulação do fármaco. A análise termogravimétrica indicou estabilidade térmica da formulação até 210 °C. Além disso, as curvas de DSC e TG confirmaram a obtenção de um sistema com características físico-químicas próprias.

A formulação foi estável após 60 dias de armazenamento (4 °C) para os parâmetros diâmetro médio, IP e PZ. A concentração de BZN encapsulada foi mantida por 14 dias e permaneceu praticamente estável após 28 dias. Por fim, o CLN-F apresentou baixo potencial hemolítico e menor toxicidade em células da linhagem L929 em comparação ao BZN livre, sem perda da atividade tripanocida nas maiores concentrações avaliadas. Desta forma, a formulação desenvolvida é promissora para os testes em formas amastigotas e apresenta potencial para o tratamento da DC.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABURAHMA, M. H.; BADR-ELDIN, S. M. Compritol 888 ATO: a multifunctional lipid excipient in drug delivery systems and nanopharmaceuticals. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 11, n. 12, p. 1865-83, Dec 2014.
- ALMEIDA, O. P. *et al.* Validation of a Chromatographic Analytical Method for Quantification of Benznidazole Incorporated in Nanostructured Lipid Formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 2, 2017.
- ALPERN, J. D.; LOPEZ-VELEZ, R.; STAUFFER, W. M. Access to benznidazole for Chagas disease in the United States-Cautious optimism? **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 9, Sep 2017.
- ALTCHEH, J. *et al.* Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. **Pediatrics**, v. 127, n. 1, p. e212-8, Jan 2011.
- ALVAREZ, G. *et al.* Identification of a new amide-containing thiazole as a drug candidate for treatment of Chagas' disease. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 3, p. 1398-404, 2015.
- ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharm Res**, v. 28, n. 5, p. 978-85, May 2011.
- ARGIMÓN, M. *et al.* Development and Characterization of Vitamin A-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Topical Application. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 7, p. 1177-1184, 2017.
- ARGOLO, A. M. *et al.* **Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008.
- BAHARI, L. A. S.; HAMISHEHKAR, H. The Impact of Variables on Particle Size of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers; A Comparative Literature Review. **Adv Pharm Bull**, v. 6, n. 2, p. 143-51, Jun 2016.
- BALOUZ, V.; AGUERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. **Adv Parasitol**, v. 97, p. 1-45, 2017.
- BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 9, n. 5, p. 497-508, May 2012.
- BELOQUI, A. *et al.* Nanostructured lipid carriers as oral delivery systems for poorly soluble drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 42, p. 144-154, 2017.
- BELOQUI, A. *et al.* Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine**, v. 12, n. 1, p. 143-61, Jan 2016.
- BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron Emulsions as Colloidal Drug Carriers for Intravenous Administration: Comprehensive Physicochemical Characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 11, p. 1069-79, 1993.

BERMUDEZ, J. *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1-16, 2016.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Anvisa, 2010.

BRUXEL, F. *et al.* Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. 6, p. 379-402, 2007.

CARVALHO, A. B.; GOLDENBERG, R. C. D. S.; CAMPOS DE CARVALHO, A. C. Cell therapies for Chagas disease. **Cytotherapy**, v. 19, n. 11, p. 1339-1349, 2017.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum Exp Toxicol**, v. 25, n. 8, p. 471-9, Aug 2006.

CHEMICALIZE. **Benznidazole**. 2018. Disponível em: <  
<https://chemicalize.com/#/calculation>>. Acesso em: 16/08/2018.

CORRIAS, F.; LAI, F. New methods for lipid nanoparticles preparation. **Recent Pat Drug Deliv Formul**, v. 5, n. 3, p. 201-13, Sep 2011.

COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 10, n. 4, p. 549-554, 2009.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, Jul 2009.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 856-862, 2014.

CRESPILLO-ANDÚJAR, C. *et al.* Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. **Clinical Microbiology and Infection**, 2018.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 62-76, 2011.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 139-151, 2012.

DATE, A.; JOSHI, M.; PATRAVALE, V. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 505-521, 2007.

DAVANÇO, M. G. *et al.* Benznidazole Extended-Release Tablets for Improved Treatment of Chagas Disease: Preclinical Pharmacokinetic Study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2492-2498, 2016.

DE FREITAS, M. V. *et al.* Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 1, p. 219-224, 2008.

DE MELO, P. N. *et al.* Designing and monitoring microstructural properties of oligosaccharide/co-solvent ternary complex particles to improve benznidazole dissolution. **Journal of Materials Science**, v. 53, n. 4, p. 2472-2483, 2017.

DEL MORAL SANCHEZ, J. M. *et al.* Biopharmaceutical optimization in neglected diseases for paediatric patients by applying the provisional paediatric biopharmaceutical classification system. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 2231-2241, 2018.

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1-10, 2016.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DOCAMPO, R. Recent Developments in the Chemotherapy of Chagas' Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 1157-1164, 2011.

DURÁN, N. *et al.* State of the Art of Nanobiotechnology Applications in Neglected Diseases. **Current Nanoscience**, v. 5, p. 396-408, 2009.

FERRAZ, L. R. D. M. *et al.* Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on Benznidazole. **Acta Tropica**, v. 185, p. 127-132, 2018.

FERREIRA, R. T. B.; BRANQUINHO, M. R.; CARDARELLI-LEITE, P. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 2, n. 4, 2014.

FINI, A. *et al.* Theophylline-Loaded Compritol Microspheres Prepared by Ultrasound-Assisted Atomization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 2, p. 743-757, 2011.

FONSECA-BERZAL, C. *et al.* Exploring the potential activity spectrum of two 5-nitroindazolinone prototypes on different Trypanosoma cruzi strains. **Parasitology Open**, v. 1, 2015a.

FONSECA-BERZAL, C. *et al.* Further insights into biological evaluation of new anti-Trypanosoma cruzi 5-nitroindazoles. **Parasitol Res**, v. 113, n. 3, p. 1049-56, 2014.

FONSECA-BERZAL, C. *et al.* Novel solid dispersions of benznidazole: Preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. **Experimental Parasitology**, v. 149, p. 84-91, 2015b.

GABA, B. *et al.* Nanostructured lipid (NLCs) carriers as a bioavailability enhancement tool for oral administration. **Drug Delivery**, v. 22, n. 6, p. 691-700, 2014.

GANESAN, P.; NARAYANASAMY, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p. 37-56, 2017.

GARALA, K. *et al.* Formulation and evaluation of periodontal in situ gel. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 3, n. 1, p. 29-41, 2013.

GARCÍA-MILLÁN, E.; QUINTÁNS-CARBALLO, M.; OTERO-ESPINAR, F. J. Solid-state characterization of triamcinolone acetonidena nosuspensiones by X-ray spectroscopy, ATR Fourier transforms infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry analysis. **Data in Brief**, v. 15, p. 133-137, 2017.

GARCÍA, M. C.; MANZO, R. H.; JIMENEZ-KAIRUZ, A. F. Extemporaneous benznidazole oral suspension prepared from commercially available tablets for treatment of Chagas disease in paediatric patients. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 7, p. 864-870, 2015.

GHASEMIYEH, P.; MOHAMMADI-SAMANI, S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 4, p. 288-303, 2018.

GLAVCHEVA-LALEVA, Z. *et al.* Obtaining of Modifiers for Reduced Friction by Esterification of Waste Glycerol from Biodiesel Production and Sylfat 2. **Chemical Engineering and Science**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2015.

GONULLU, U. *et al.* Formulation and characterization of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers and nanoemulsion of lornoxicam for transdermal delivery. **Acta Pharm**, v. 65, n. 1, p. 1-13, 2015.

HAMDANI, J.; MOËS, A. J.; AMIGHI, K. Physical and thermal characterisation of Precirol® and Compritol® as lipophilic glycerides used for the preparation of controlled-release matrix pellets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, n. 1, p. 47-57, 2003.

HEURTAULT, B. E. *et al.* Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283-4300, 2003.

HUA, S.; WU, S. Y. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, 2013.

JAISSWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123-127, 2014.

KASIM, N. A. *et al.* Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2004.

KHALIL, N. M. *et al.* Nanotechnological Strategies for the Treatment of Neglected Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, p. 7316-7329, 2013.

KIEFER, J. *et al.* Infrared Spectroscopy of Bilberry Extract Water-in-Oil Emulsions: Sensing the Water-Oil Interface. **Biosensors**, v. 6, n. 2, p. 13, 2016.

LAMAS, M. C. *et al.* Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 239-243, 2006.

LEONARDI, D.; SALOMON, C. J. Unexpected Performance of Physical Mixtures over Solid Dispersions on the Dissolution Behavior of Benznidazole from Tablets. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 3, p. 1016-1023, 2013.

LEONARDI, D. *et al.* Development of novel formulations for Chagas' disease: Optimization of benznidazole chitosan microparticles based on artificial neural networks. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1-2, p. 140-147, 2009.

LI, H.-J. *et al.* Large-scale synthesis and self-organization of silver nanoparticles with Tween 80 as a reductant and stabilizer. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 1, p. 612, 2012.

LI, H. *et al.* Size-exclusive effect of nanostructured lipid carriers on oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 1, p. 524-537, 2016.

LI, Z. *et al.* Studies on crystallinity state of puerarin loaded solid lipid nanoparticles prepared by double emulsion method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 99, n. 2, p. 689-693, 2009.

MACHADO, F. S. *et al.* Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 753-770, 2012.

MADY, C.; IANNI, B. M.; JR, J. L. D. S. Benznidazole and Chagas disease: can an old drug be the answer to an old problem? **Expert Opinion**, v. 17, n. 10, p. 1427-1433, 2008.

MARCIAL, S. P. D. S.; CARNEIRO, G.; LEITE, E. A. Lipid-based nanoparticles as drug delivery system for paclitaxel in breast cancer treatment. **J Nanopart Res**, v. 19, n. 340, 2017.

MAXIMIANO, F. P. *et al.* Development of effervescent tablets containing benznidazole complexed with cyclodextrin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 6, p. 786-793, 2011a.

MAXIMIANO, F. P.; COSTA, G. H. Y.; SOUZA, J. D. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1714-1719, 2010.

MAXIMIANO, F. P. *et al.* Benznidazole microcrystal preparation by solvent change precipitation and in vivo evaluation in the treatment of Chagas disease. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, n. 3, p. 377-384, 2011b.

MAYA, J. D. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 165-196, 2001.

MEIRA, C. S. *et al.* In vitro and in vivo antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 22, n. 11, p. 969-74, 2015.

MOLINA, I. *et al.* Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufacturers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6125-6131, 2015.

MORENO, M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 918-924, 2010.

MORILLA, M. J. *et al.* Development and in vitro characterisation of a benznidazole liposomal formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1-2, p. 89-99, 2002.

MORILLA, M. J. *et al.* Liposomal Benznidazole: A High-Performance Liquid Chromatographic Determination for Biodistribution Studies. **Journal of Chromatographic Science**, v. 41, n. 8, p. 405-409, 2003.

MORILLA, M. J. *et al.* Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 2, p. 311-318, 2004.

MORILLA, M. J.; PRIETO, M. J.; ROMERO, E. L. Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 213-129, 2005.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**, v. 10, n. 3, p. 465-481, 2015.



MUCHOW, M.; MAINCENT, P.; MÜLLER, R. H. Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for Oral Drug Delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 12, p. 1394-1405, 2008.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131-S155, 2002.

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 3, p. 305-313, 2015.

NASTITI, C. *et al.* Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 37, 2017.

NEGI, L. M.; JAGGI, M.; TALEGAONKAR, S. Development of protocol for screening the formulation components and the assessment of common quality problems of nano-structured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1-2, p. 403-410, 2014.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011.

NIU, Z. *et al.* Lipid-based nanocarriers for oral peptide delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 106, p. 337-354, 2016.

NOUDEH, G. D.; KHAZAEI, P.; RAHMANI, P. Study of the Effects of Polyethylene Glycol Sorbitan Esters Surfactants Group on Biological Membranes. **International Journal of Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 27-33, 2008.

OLIVEIRA, M. D. F. *et al.* Tratamento Etiológico da Doença de Chagas no Brasil. **Revista de patologia tropical**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

OPAS. Organização Pan Americana De Saúde. **Doença de Chagas: guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de chagas aguda transmitida por alimentos**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS: 92 p. 2009.

OPAS. Organização Pan Americana De Saúde. **Enfermedade de Chagas**. 2018. Disponível em: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es) >. Acesso em: 07/08/2018.

PALMEIRO-ROLDÁN, R. *et al.* Development of novel benznidazole formulations: Physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, n. 1-2, p. 110-117, 2014.

PATEL, D. *et al.* Nanostructured Lipid Carriers (NLC)-Based Gel for Topical Delivery of Aceclofenac: Preparation, Characterization and In Vivo Evaluation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 80, n. 3, p. 749-764, 2012.

PATEL, R. P.; JOSHI, J. R. An Overview on Nanoemulsion: a novel approach. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 12, p. 4640-4650, 2012.

PECH-CANUL, Á. D. L. C.; MONTEÓN, V.; SOLÍS-OVIEDO, R.-L. A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology Research**, v. 2017, p. 1-13, 2017.

PEDRA, R. D. A. *et al.* Desafio em saúde pública: tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 13, n. 2, p. 5-9, 2011.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PERON, F. *et al.* Effects of (1E,4E)-2-Methyl-1,5-bis(4-nitrophenyl)penta-1,4-dien-3-one on *Trypanosoma cruzi* and Its Combinational Effect with Benznidazole, Ketoconazole, or Fluconazole. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-11, 2017.

PINHEIRO, E. *et al.* Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 3, p. 296-300, 2017.

POONIA, N. *et al.* Nanostructured lipid carriers: versatile oral delivery vehicle. **Future Science OA**, v. 2, n. 3, p. FSO135, 2016.

RADTKE, M.; SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. Nanostructured Lipid Carriers: A Novel Generation of Solid Lipid Drug Carriers. **Pharmaceutical Technology Europe**, v. 17, n. 4, p. 45-50, 2005.

RAHMAN, Z.; ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 127-137, 2010.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RIDOLFI, D. M. *et al.* In vitro cytotoxicity assays of solid lipid nanoparticles in epithelial and dermal cells. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 304, n. 1, 2011.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4-5, p. 576-588, 2010.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6<sup>a</sup> ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2009.

SALES JUNIOR, P. A. *et al.* Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289-1303, 2017.

SANTOS-MAGALHAES, N. S. *et al.* Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **Int J Pharm**, v. 208, n. 1-2, p. 71-80, Nov 4 2000.

SCALISE, M. L. *et al.* Promising Efficacy of Benznidazole Nanoparticles in Acute Trypanosoma cruzi Murine Model: In-Vitro and In-Vivo Studies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 2, p. 388-393, 2016.

SCHÖLER, N. *et al.* Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. **International Journal of Pharmaceutics** v. 231, p. 167-176, 2002.

SERCOMBE, L. *et al.* Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, 2015.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A Pharmaceutical Review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 24-32, 2010.

SILVA, J. D. F. D. *et al.* Microemulsions: Components, Characteristics, Potentialities in Food Chemistry and Other Applications. **Química Nova**, 2015.

SINGHAL, G. B. *et al.* Solid Lipid Nanoparticles and Nano Lipid Carriers: as novel solid lipid based drug carrier. **international Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 40-52, 2011.

SOARES-SOBRINHO, J. L. *et al.* A Preformulation Study of a New Medicine for Chagas Disease Treatment: Physicochemical Characterization, Thermal Stability, and Compatibility of Benznidazole. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1391-1396, 2010.

SOARES-SOBRINHO, J. L. *et al.* Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 323-330, 2012.

SOARES-SOBRINHO, J. L.; SOARES, M. F. D. L. R. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1534-1538, 2011.

SOEIRO, M. D. N. C. *et al.* In Vitro and In Vivo Studies of the Antiparasitic Activity of Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51) Inhibitor VNI against Drug-Resistant Strains of Trypanosoma cruzi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 9, p. 4151-4163, 2013.

SOLANS, C. *et al.* Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, p. 102-110, 2005.

STRECK, L. *et al.* Surfactant–cosurfactant interactions and process parameters involved in the formulation of stable and small droplet-sized benznidazole-loaded soybean O/W emulsions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 196, p. 178-186, 2014.

STRECK, L. *et al.* Phase Transitions of Isotropic to Anisotropic Biocompatible Lipid-Based Drug Delivery Systems Overcoming Insoluble Benznidazole Loading. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 981, 2016.

TOLEDO, M. J. *et al.* Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **J Antimicrob Chemother**, v. 53, n. 6, p. 1045-53, 2004.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 55-68, 2010.

VIOTTI, R. *et al.* Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Review Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 2, p. 157-163, 2009.

WANG, L.; LIU, W.; HUANG, X. An approach to revolutionize cataract treatment by enhancing drug probing through intraocular cell line. **Libyan Journal of Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1500347, 2018.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.

WHO. World Health Organization. **Distribution of cases *Trypanosoma cruzi* infection, based on official estimates and status of vector transmission, worldwide, 2006-2009**. 2010. Disponível em: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_chagas\\_2009.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png) >. Acesso em: 07/08/2018.

WHO. World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2018. Disponível em: < <http://www.who.int/chagas/en/> >. Acesso em: 07/08/2018.

WULFF-PEREZ, M. *et al.* Controlling lipolysis through steric surfactants: new insights on the controlled degradation of submicron emulsions after oral and intravenous administration. **Int J Pharm**, v. 423, n. 2, p. 161-6, 2012.

YEMPARALA, V. *et al.* Effect of the excipient concentration on the pharmacokinetics of PM181104, a novel antimicrobial thiazolyl cyclic peptide antibiotic, following intravenous administration to mice. **Results Pharma Sci**, v. 4, p. 34-41, 2014.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v. 184, p. 38-52, 2018.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B. *et al.* A novel ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* is involved in natural resistance to benznidazole. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 433-444, 2015.

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 2, p. 240-53, Mar 2012.

ZINGALES, B. *et al.* Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 828-833, 2014.